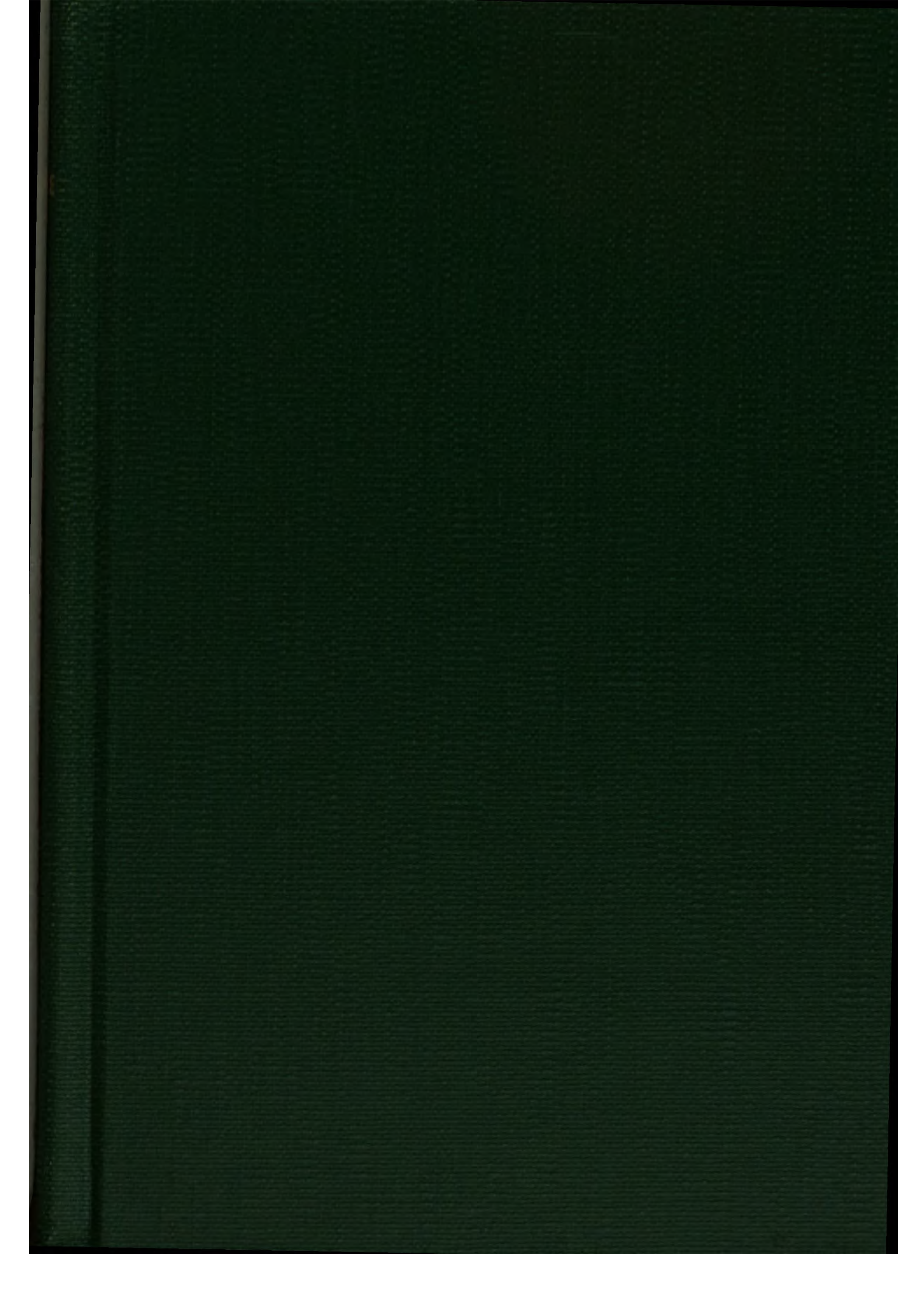
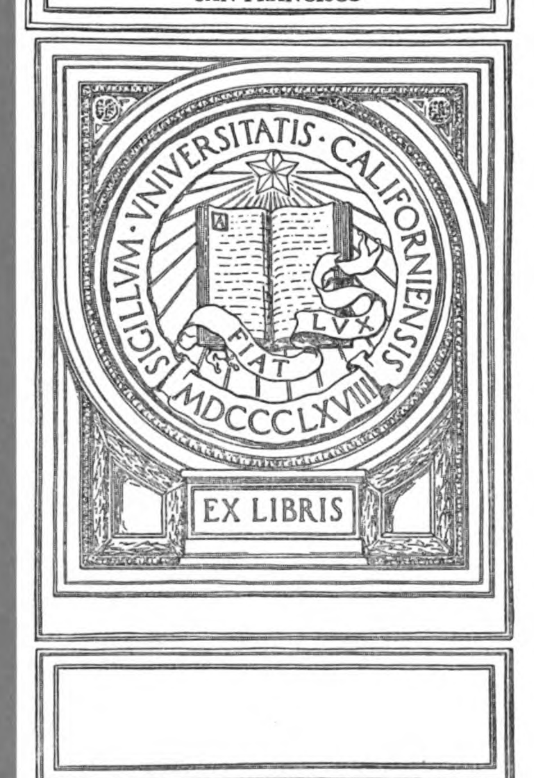
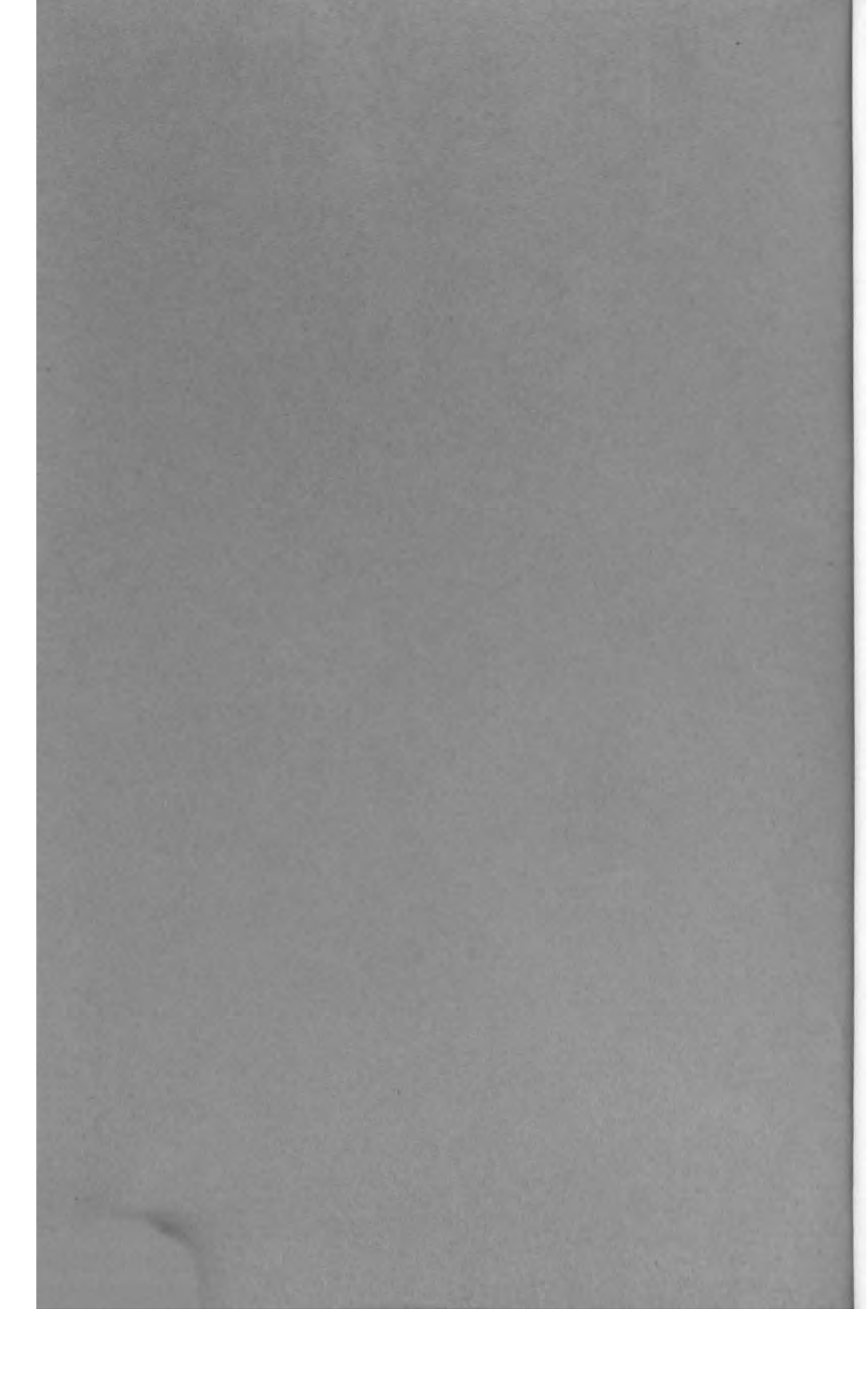



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS





Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Breslau, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Einunddreißigster Band.

Anastatischer Neudruck



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1911.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Christian Bohr †

Am 3. Februar 1911 ist Prof. Christian Bohr, der Direktor des Physiologischen Universitätsinstituts in Kopenhagen, gestorben. Trauernd steht nicht nur die dänische Wissenschaft am Grabe dieses ausgezeichneten Forschers, der in der ganzen physiologischen Welt, besonders aber in Deutschland, hochgeschätzt gewesen ist.

Bohr ist in Kopenhagen am 14. Februar 1855 geboren; er wurde 1872 Student und arbeitete schon seit 1874 im Laboratorium seines Vorgängers, Professor Panum. 1878 legte er das medizinische Examen ab und habilitierte sich bereits 1880; in den Jahren 1881 und 1883 arbeitete er bei Professor Ludwig in Leipzig, und als Professor Panum starb, wurde Bohr 1886 sein Nachfolger in der Stellung, die er bis zu seinem Tode so glänzend ausfüllte.

Nach seiner Berufung warf er sich mit seiner ganzen jugendlichen Kraft auf die experimentelle Laboratoriumarbeit und veröffentlichte in den folgenden Jahren eine Reihe Arbeiten von allergrößter Bedeutung, wie 1887: „Über die Kohlensäurebindung des Hämoglobins", 1889: „Über die Lungenrespiration" — wo er die Auffassung der Lunge als Drüse darlegte — und 1890 vier Abhandlungen über Sauerstoffbindungen des Blutes. Bohrs Fruchtbarkeit ist in diesen Jahren erstaunlich.

Wenn auch einige seiner Arbeiten aus diesen Jahren modifiziert worden sind, so unterliegt es doch keinem Zweifel und wird es gewiß auch von allen Seiten an-

erkannt, daß eben seine höchst originellen Forschungen den Anstoß zu einer großen Reihe Untersuchungen gegeben haben, die später von verschiedenen Seiten mit Rücksicht auf diese Fragen veröffentlicht wurden. In den folgenden Jahren veröffentlichte Bohr eine große Reihe Arbeiten, die seine Ideen auf diesem Gebiete ergänzen und weiter entwickeln und sich mit einer Reihe anderer, naheliegender Stoffe beschäftigen. Erwähnt seien noch seine im Verein mit Henriques ausgeführten Untersuchungen über die Verbrennung in den Lungen, eine Arbeit von größter Bedeutung, seine Untersuchungen über die Sauerstoffsekretionen in der Schwimmblase — eine selten elegante Arbeit — und seine Studien über den Stoffwechsel des Embryos. In seinen späteren Jahren widmete sich Bohr dem Studium der Vitalkapazität der Lungen unter verschiedenen Verhältnissen und begründete auf Basis seiner Untersuchungen eine ganz neue Betrachtung des Emphysems und dessen Bedeutung. Diese Arbeiten haben das größte Aufsehen erregt.

Bohr übte seine Lehrertätigkeit mit großer Gewissenhaftigkeit aus und ist stets bestrebt gewesen, die Unterrichtsverhältnisse in der Physiologie zu verbessern. Bohr hat eine ungewöhnlich große Anzahl Schüler gehabt, von denen die meisten sich später der Physiologie oder verwandten Fächern als ihrer Lebensaufgabe gewidmet haben; auch war er ein seltener Lehrer: stets zu helfen und zu unterstützen bereit.

Bohr war eine offene und mitteilsame Natur; er stand mit seinen Schülern auf einem vollständig kameradschaftlichen Fuß und ergriff jede Gelegenheit, die Aufgaben und Fragen, die ihn beschäftigten, mit ihnen zu besprechen. Die Anzahl der Arbeiten, die aus Bohrs Laboratorium hervorgingen, war groß. Sie behandeln hauptsächlich Fragen, die in näherer oder

fernerer Berührung mit den Aufgaben standen, die ihn wesentlich beschäftigten; ein Teil ist in dieser Zeitschrift veröffentlicht.

Als Mensch war Bohr feinfühlend, freundlich und hilfreich. Sein lebhaftes, gewinnendes Wesen und seine persönliche Liebenswürdigkeit verschafften ihm auch viele Freunde im Auslande. Sein Auftreten war einfach und bescheiden, mitunter beinahe verlegen. Er vermied am liebsten Streit — es ist daher charakteristisch, daß er kaum in eine wissenschaftliche Polemik verwickelt gewesen ist.

Mit seinen hervorragenden Kenntnissen auf dem speziellen Gebiete „des respiratorischen Stoffwechsels" verband er ein großes physikalisches und mathematisches Wissen. Auch hatte er viele Interessen außerhalb seines Berufes, er war ein Bewunderer und Kenner von Goethe und Holberg und hegte großes Interesse für Sport.

Bohr ist nur 55 Jahre alt geworden. Am 23. Februar hätte er seine 25 jährige Anstellung bei der Universität feiern können, und seine Schüler und nordischen Kollegen beabsichtigten, an diesem Tage ihn mit einem Festbande zu feiern, der gerade jetzt in Leipzig gedruckt ist; — nun wird er leider den Charakter einer Erinnerungsschrift bekommen. Anscheinend war Bohr frisch und gesund; mitten in der Arbeit ereilte ihn ein sanfter Tod.

Über Veronal.

Von

A. Gröber.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1910.)

Mit 4 Figuren im Text.

Fast könnte es überflüssig erscheinen, heute noch über Veronal zu schreiben. Sind doch jetzt bereits 7 Jahre vergangen, seit E. Fischer und J. v. Mering[1]) das Veronal als Schlafmittel empfohlen und in die Praxis eingeführt haben.

Um so überraschender ist die Tatsache, daß eine genauere Untersuchung des Veronals auf seine pharmakodynamischen und toxischen Wirkungen hin bis jetzt nicht ausgeführt ist. Wenigstens ist es mir nicht gelungen, in der mir zugängigen Literatur auch nur eine Arbeit über Veronal zu finden, mit experimentell gewonnenen Resultaten, die einigen Anspruch auf Genauigkeit machen könnten.

Ja, es ist bisher nicht einmal die geringste, absolut tödliche Dosis pro Kilogramm Tier — besonders Warmblüter — für das Veronal festgestellt worden!

O. Schmiedeberg gibt in der neuesten (6.) Auflage seines Grundrisses der Pharmakologie noch 1,0 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht

---

[1]) Über eine neue Gruppe von Schlafmitteln. Therapie der Gegenwart, 1903, 97 ff.

als tödliche Dosis an, eine Zahl, die er wohl der Arbeit von P. Kleist[1]) entnommen hat, die, wie ich sogleich nachweisen werde, nichts weniger als genau ist. Bevor ich näher auf sie eingehe, will ich kurz einige andere, kürzere Arbeiten erwähnen, deren ich hier gedenken muß.

Ich nenne zuerst die erste Arbeit über Veronal überhaupt, die schon oben zitierte von E. Fischer und J. v. Mering[2]).

Hier finden sich über Veronal nur zwei Versuche, an einem und demselben Hunde nacheinander ausgeführt, als Versuch Nr. 9. Die übrigen Versuche kommen hier nicht in Betracht; sie beziehen sich auf dem Veronal verwandte Körper (Proponal usw.), auf die Ausscheidung all dieser Körper aus dem Organismus usw., wie denn überhaupt die Tendenz dieser Arbeit ausschließlich die ist, aus einer Gruppe ähnlich konstituierter, ähnlich — nur quantitativ verschieden — wirkender Substanzen die herauszufinden, deren Wirkung den gestellten Anforderungen — möglichst große Schlafwirkung bei möglichst geringer Gift- bzw. Nebenwirkung — am nächsten kommt. Der Hund erhielt im ersten Versuche 0,133 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht, im zweiten 0,2 g. Völlige Erholung.

Aus anderen Gründen sei hier noch die Arbeit von C. Trautmann[3]) angeführt. Trautmann findet, daß in den ersten 3 Tagen nach allmählicher Einnahme von 4,0 g Veronal die N-Ausscheidung um 3 g vermindert wird = 90 g Muskelfleisch, „die eingespart werden". Trautmann empfiehlt daher die Darreichung von Veronal als Schlafmittel — falls ein solches indiziert ist —, „bei allen Erkrankungen, bei denen erfahrungsgemäß eine Steigerung des Eiweißzerfalles stattfindet" (auch bei febrilen Erkrankungen, Diabetes mellitus usw.).

Sonst nenne ich hier noch Berent[4]), auf den ich später zurückkomme, und H. Raschkow[5]) (den auch P. Kleist zitiert) mit Tierversuchen. Die übrigen Autoren bringen Beobachtungen am Krankenbette über die Schlafwirkung des Veronals am Menschen bei verschiedenen Krankheiten, oder sie beschreiben — oder begutachten — Fälle von Veronalvergiftungen an Menschen. Von letzteren Fällen sind die interessantesten wohl, als Vertreter der akuten Vergiftung der sog. Holzmindener Fall — Harnack[6]), Jacobj[7]), —, als Vertreter der chro-

---

[1]) Über die physiologische Wirkung des Veronals. Ibidem, 1904.

[2]) Siehe Fußnote 1 Seite 1.

[3]) Der Einfluß des Veronals auf die Stickstoffausscheidung beim Menschen. Ibidem, 1903, 438f.

[4]) Über Veronal. Therap. Monatshefte 17, 279, 1903.

[5]) Veronal, ein neues Schlafmittel. Wiener klin. Rundschau, 1903, 744f.

[6]) a) Münch. med. Wochenschr. 1905, H. 47; b) Vierteljahrsschrift für gerichtl. Medizin 1909, H. 3: „Nochmals der Holzmindener Fall".

[7]) Ibidem, H. 2: „Beitrag zur Beurteilung der Filix- u. Veronalvergiftung".

nischen Vergiftung oder des Veronalismus der von R. Laudenheimer[1]) beschriebene Fall.

Auf alle diese klinischen bzw. kriminellen Fälle kann ich hier zunächst nicht weiter eingehen. Über die akuten Veronalvergiftungen speziell wird am Schlusse dieser Arbeit noch einiges zu sagen sein.

Jetzt komme ich zur Besprechung der schon oben erwähnten Arbeit von P. Kleist. Kleist zieht aus seinen zu Beginn der Arbeit gebrachten Froschversuchen (aus welchen von diesen oder ob aus allen, wird nicht gesagt) den Schluß: „Die letale Dosis beträgt ebenso wie beim Warmblüter (Raschkow . . .) 1 g pro Kilogramm Frosch.“ Zur Berechnung der letalen Dosis Veronal pro Kilogramm Frosch sind von seinen Froschversuchen aber nur die Versuche Nr. 1, 2, 4, 5 brauchbar. Frosch Nr. 4 mit 0,5 g Veronal pro Kilogramm erholt sich, die anderen drei (von 1,4 g bis 4,25 g Veronal pro Kilogramm) sterben. Das gestattet, da eine Einengung (größte Dosis bei der absolut sicher Erholung, kleinste, bei der absolut sicher Tod eintritt) nicht stattgefunden hat, nur die Berechnung eines Mittelwertes aus den genannten 4 Versuchen, und der ist = 1,91 g Veronal pro Kilogramm Frosch, nicht 1,0 g. — Bei Frosch Nr. 3 fehlt die Gewichtsangabe, die Frösche Nr. 6 und 7 sind Reflexfrösche.

Diesen 7 Froschversuchen folgt Versuch Nr. 10, am Hunde, dessen Gewicht nicht angegeben ist, sich aber zweifellos in Versuch 8 oder 9 finden würde (denn es heißt am Anfang von Versuch 10: „Derselbe Hund“), wenn nicht leider diese beiden Versuche vollständig fehlten. Versuch 11 am gleichen Hunde enthält auch keine Gewichtsangabe. Es folgen dann 3 Versuche an Kaninchen (Nr. 12 mit 0,06 g Veronal, Nr. 13 am gleichen Tier wie 12 mit 0,12 g Veronal, Nr. 14 mit 0,27 g Veronal pro Kilogramm Tier). Alle 3 Kaninchen erholen sich.

Endlich folgt eine Serie von Versuchen an zwei kleinen Hunden (Alter: 8 Wochen). Hund a wog 2,44 kg, Hund b 2,83 kg. Die Normaltemperaturen schwanken zwischen 37,9° und 38,3° C, rectal gemessen. Beginn der Versuchsreihe am 18. IV. 04. Beide Tiere erhalten allabendlich Veronal, und zwar Hund a ca. 0,20 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht, Hund b ca. 0,18 g pro Kilogramm. Am 20. IV. schon erscheint b krank. Die Injektionsstellen sind druckempfindlich. Hund a stirbt, von einem größeren Hund getreten, an Leberruptur am 22. IV. 04, also am 5. Tage des Versuchs. Hund b zeigt am 25. IV. an zwei Injektionsstellen Abscesse, die inzidiert, tamponiert und verbunden werden. Am 29. IV. erhält Hund b das $1^1/_2$fache der bisherigen Dosis 10^{20} morgens. 5^h nachmittags moribund, Atmung 1 bis 3 pro Minute, Temperatur anal 24,9° C, in der frisch eröffneten Bauchhöhle 34,9° C (!).

Am 19. IV. ist übrigens bei der Injektion scheinbar eine Vene verletzt worden, bzw. die Injektion zufällig intravenös geschehen: „10^{45} 0,5 g Veronal in H_2O gelöst, an zwei Stellen des Rückens injiziert. Aus einer

---

[1]) Therapie der Gegenwart 1904, Januarheft.

Injektionsstelle quellen ein paar Tropfen Blut." Nach 2 Minuten mühsamen Sichfortschleppens bricht das Tier plötzlich zusammen. Kleist selbst nimmt eine Gefäßverletzung an.

Kleist sagt im Resumée, das per os ungelöst applizierte Veronal werde durch das Alkali des Darmes bald gelöst. Zirka $^1/_2$ Stunde nach Eingabe des Veronals beginne seine Resorption, die schneller eintrete bei Applikation einer Lösung von Veronal, per os oder subcutan. Bei Anlegung eines subcutanen Depots von ungelöstem Veronal ist die Resorption gering. So war ein Depot von 4,0 g Veronal erst nach einigen Tagen völlig resorbiert.

Zittern während des Schlafes, „als ob die Tiere frieren". Infolge der Herabsetzung des Stoffwechsels (Kleist zitiert hier die N-Ausscheidungsversuche von Trautmann[1]) Absinken der Temperatur. Es heißt wörtlich: „In der Tat konnte bei verschiedenen Versuchen eine Temperaturerniedrigung festgestellt werden, die bei größeren Dosen Veronal bis zu 3° C beträgt (Versuch Nr. 15, Hund b, 18. IV. 04)[2]). Es ist möglich, daß der unruhige Schlaf nach großen Dosen, und das nach dem Erwachen auftretende Unlustgefühl, das sich durch Stöhnen und Umherwerfen zu erkennen gab, zum Teil durch diese Temperaturerniedrigung bedingt ist." Kleist schließt aus dem Verlaufe der Temperaturerniedrigung, daß die Veronalwirkung 3 Stunden nach Eingabe am stärksten sei. „Intravenöse Injektionen wirken sofort und führen in großen Dosen augenblicklich schwere komatöse Zustände herbei." Das Zittern während des Veronalschlafes faßt Kleist auf als künstlichen Schüttelfrost infolge Kontraktion der Hautgefäße und hierdurch hervorgerufenes Frostgefühl.

Aus dem hier Referierten, aus der Tatsache, daß Versuch 8 und 9 — offenbar vom Verfasser unbemerkt[3]) — in der Publikation völlig fortgeblieben sind, aus dem Umstand, daß Verfasser bei seinen Froschversuchen scheinbar überhaupt keine Berechnung pro Kilogramm Tiergewicht ausgeführt hat, aus dem Widerspruch zwischen der bei Analmessung (24,9° C) und der bei Messung in der eröffneten Bauchhöhle gefundenen Temperatur (34,9° C) — eine Differenz von 10° C! — scheint mir hervorzugehen, daß diese einzige ausführlichere Experimentalarbeit über Veronal, die ich daher auch ausführlicher besprechen mußte, zu wenig exakt ist, als daß man eine sichere Beurteilung der Wirkungsweise des Veronals auf sie gründen könnte.

Ich komme jetzt zu der schon oben zitierten Arbeit von H. Raschkow. Er bringt 6 Versuche an Hunden, und zwar gibt er folgende Dosen von Veronal pro Kilogramm Tier: Im Versuch 1: 0,104 g,

---

[1]) S. o.

[2]) Von 38,0° C auf 35,0° C an diesem Tage. Später infolge der Abscesse kein reines Bild (offenbar Fieber!).

[3]) Das geht hervor aus den Anfangsworten von Versuch 10: „Derselbe Hund".

2: 0,143 g, 3: 0,21 g, 4: 0,29 g (0,2857 g genauer). Die Tiere dieser 4 Versuche blieben am Leben. Er gab ferner pro Kilogramm Hund im Versuch 5: 1,25 g, 6: 0,86 g Veronal. Diese beiden Tiere starben. Verfasser sagt dazu: „Pro Kilogramm Tier kommt also im Durchschnitt 1 g Veronal auf die letale Dosis." — Dazu ist noch zu bemerken, daß in Versuch 1 bis 4 das Veronal in Milch gereicht wurde. Es wird nicht gesagt, ob gelöst oder aufgeschwemmt. Da Verfasser sagt, die Tiere nehmen es, so kam wohl der Magenschlauch nicht zur Anwendung. Es könnte also immerhin etwas zurückgeblieben sein. In Versuch 5 und 6 wurde das Veronal auf Zucker und Semmel bzw. auf Zucker, also ganz sicher ungelöst gegeben. Daraus erklärt sich wohl auch der späte Eintritt des Exitus letalis (in Fall 5 erst nach $> 8^1/_4$ Stunden, in Fall 6 nach $7^1/_4$ Stunden) bei so großen Gaben. Auch diese Arbeit, auf die sich Kleist bezieht, ist zur Feststellung der letalen Dosis unbrauchbar Denn Verfasser macht in der Dosierung des Veronals einen Sprung von 0,29 g pro Kilogramm auf 0,86 g bzw. 1,25 g pro Kilogramm und erklärt nun, es komme durchschnittlich 1,0 g auf die letale Dosis, ohne Rücksicht auf Gaben, die zwischen 0,29 und 0,86 g liegen und tödlich wirken könnten!

Berent (s. o.) hat bei seinen 3 Tierversuchen keinen Exitus letalis erzielt. Er gab dem gleichen Hunde 1. 0,147 g, nach 3 Tagen 0,245 g, nach weiteren 3 Tagen 0,4 g Veronal pro Kilogramm Körpergewicht. Im letzten dieser 3 Versuche erbrach das Tier reichlich in der Zeit vom Ende der 1. bis zum Ende der 5. Stunde post applicationem. Es hat demnach reichlich Speise im Magen gehabt. Dieser Umstand allein bedingte schon eine Abschwächung der Veronalwirkung infolge verlangsamter Resorption. Dazu kommt eine weitere Beeinträchtigung der Wirkung dadurch, daß mit den Speiseresten ganz zweifellos ein Teil des eingeführten Veronals durch das Erbrechen eliminiert wurde.

Die in den nachstehenden Tabellen publizierten Versuche habe ich auf Anregung von Herrn Geheimrat Jacobj s. Z. angestellt, unter möglichster Beachtung aller ev. wichtigen Punkte (Atmung, Puls, Temperatur, Reflexe usw.). Wo Versuchsfehler untergelaufen sein könnten, werde ich besonders darauf hinweisen. Die Froschversuche sind mehr als Kontrolle für die am Fleischfresser beobachteten krampfhaften Erscheinungen anzusehen. Auf Feststellung der geringsten eben noch sicher tödlichen Dosis kam es mir beim Warmblüter, nicht beim Frosche an. — Ich hoffe im folgenden ein den Tatsachen entsprechendes Bild von der Wirkung des Veronals geben zu können.

Bevor ich auf meine Versuchsresultate näher eingehe, möchte ich kurz noch einige Erläuterungen geben.

Was unter „Ohrmuschel-Reflex“ zu verstehen ist, geht aus Versuch 4, Spalte 4, 11[45] deutlich hervor. Im selben Versuche ist später von einem Lid- und Schnurrhaar-Reflex die Rede. Letzterer läßt sich von denselben Punkten auslösen, wie der Lidreflex, scheint aber, wenigstens bei der Katze, noch empfindlicher zu sein. Die Auslösung geschieht mit einem feinen Stäbchen, einer stumpfen Bleistiftspitze oder dgl. von einem Punkte aus, der ca. $^1/_2$ cm hinter und ca. $^1/_2$ bis $^3/_4$ cm über dem äußeren Lidwinkel der Katze liegt. Man trifft dort einen Punkt des oberen Randes der Orbita. Es erfolgt Schlußbewegung des oberen Lids und Aufstellen der größten Schnurrhaare. Dieser Reflex läßt sich nicht selten auch längs des ganzen unteren und ev. auch eines Teils des oberen Orbitalrandes auslösen, wenn auch meist schwächer.

Ferner möchte ich ausdrücklich betonen, daß ich den bei der Atemfrequenz- und Atemvolumprüfung vor dem Versuche gewonnenen Werten weder beim Kaninchen noch bei der Katze einen sehr großen Anspruch auf Richtigkeit zuerkennen möchte, da die Tiere gewöhnlich infolge der nötigen Manipulationen etwas erregt waren. Anspruch auf Exaktheit haben nur die im Verlaufe der Narkose erhaltenen Werte. Aus dem gleichen Grunde wurde auf Pulsbestimmung vor dem Versuche verzichtet, besonders, da wir ohnehin wissen, daß die Pulsfrequenz des normalen Kaninchens z. B. ca. 220 bis 240 pro Minute beträgt.

Versuch 24 ist in die Tabellen nicht aufgenommen, da das Tier infolge eines Versehens bei der Dosierung eine recht reichliche, doch in ihrer Größe unbekannte Gabe Veronal erhielt. Es handelte sich um eine Katze von 2,57 kg Gewicht, Atmung 50 pro Minute = 1125 ccm, Rectaltemperatur 39,2° C. Das Tier erhielt am 24. II. 08, 8[32] zunächst 0,35 g Veronal pro Kilogramm = 0,8995 g Veronal in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C gelöst per Magenschlauch. Später (10 Minuten nach der ersten Gabe) bekam das Tier aber noch einmal eine große, wenn auch der ersten nicht gleiche Dosis, während deren Applikation es sich losmachte und entsprang, so daß die Menge des wirklich gegebenen Veronals sich nicht feststellen ließ. Das war 8[42]. 9[00] tiefer Schlaf, ohne jede Exzitation. Am 25. II. 08, morgens 8[00] tot vorgefunden, schon erkaltet. Sektion: Trachea, Larynx, Lungen völlig normal! Im Duodenum langgedehnte streifenförmige, sehr deutliche Hyperämie. Dieser Versuch ist aus später zu erörternden Gründen wichtig.

Gleichfalls nicht in die Tabellen aufgenommen ist Versuch Nr. 16. Es ist ein Blutdruck-Versuch an einer mit Veronal vergifteten Katze. Die Beschreibung folgt weiter unten.

Die Temperaturmessungen verstehen sich stets rektal in Grad C bei möglichst gleichmäßig tiefer (durch Verwendung von Kniethermometern gewährleisteter) Einführung des Quecksilbergefäßes, das ca. 8 cm über den Sphincter ani hinaufgeführt wurde. So erhält man sehr sichere, gleichmäßige und vergleichbare Resultate. Hier ist der Ort, auf den Widerspruch in den beiden Messungen von Kleist hinzuweisen: Seine Analmessung ist vermutlich im Sphincterring, oder nur eben darüber, und nicht lange genug, ausgeführt worden. Sonst ist eine derartige Verschiedenheit zwischen Anal- und direkter Bauchhöhlenmessung ganz unerklärlich! Kleist selbst scheint das übrigens nicht besonders aufgefallen zu sein, denn er äußert sich in keiner Weise dazu.

Nach diesen Vorbemerkungen komme ich nun zur Besprechung meiner Versuchsresultate. Und zwar will ich mit dem einfachsten von allem, mit der letalen Dosis beginnen.

Die geringste noch sicher tödliche Gabe Veronal liegt nach meinen Versuchen und Kontrollversuchen für Kaninchen und Katze zwischen 0,25 g und 0,3 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht, für den Hund zwischen 0,45 g und 0,5 g Veronal pro Kilogramm Tiergewicht, also für Kaninchen und Katze um $66^2/_3$ bis $75\,^0/_0$, für den Hund um 50 bis $55\,^0/_0$ tiefer als bisher — für alle Tiere ohne Unterschied — angegeben. Frösche (Ran. escul.) erholen sich nach 0,5 g Veronal pro Kilogramm völlig.

Auffällig ist in allen Versuchen, in denen die Atmung geprüft werden konnte, deren Verhalten. Selbst wenn man von den — wie schon gesagt, vielleicht zu hohen — Normalwerten (in Spalte 1) absieht, fällt doch die Herabminderung nicht nur der Frequenz, sondern auch des Volumens der einzelnen Atemzüge auf (bis auf 8,5 ccm auf einen Atemzug, Katze, Versuch 4).

Die Eigenwärme sinkt bei entsprechenden Gaben (0,35 g pro Kilogramm) enorm, bis auf 24,6° C rectal (Versuch 4). In diesem Versuche steigt trotz des schließlich tödlichen Ausganges die Temperatur nicht unbeträchtlich wieder an, um

ante mortem wieder abzusinken. Bei Versuch 23 (Katze) findet ein Absinken der Körpertemperatur auf 29,4° C (rectal) statt, ohne daß das Tier stirbt! Die Frequenz der Atmung geht in Versuch 4 auf 4 pro Minute, in Versuch 28 von 28 (Hund) auf 4 bis 6 pro Minute herab. Wie man sieht, handelt es sich bei diesen großen Ausschlägen um Fleischfresser, Katze oder Hund. Bei diesen Tieren sinkt auch die Pulsfrequenz am stärksten. Überhaupt waren an den Fleischfressern sämtliche Symptome weit stärker ausgeprägt, als beim Kaninchen. Nie fand ich beim Kaninchen ähnliche geringe Werte für Puls (bei der Katze in Versuch 4 84 pro Minute) oder Atmung wie bei den Fleischfressern, noch auch Biotsches Atmen, das in Versuch 27 ganz ausgeprägt, bei den übrigen Versuchen an Katze und Hund, wenn auch nicht so deutlich wie eben in Versuch 27 (Hund), so doch immerhin — wenigstens zeitweise — angedeutet war (so bei den Versuchen Nr. 4, 28, 29), wie ich hier zur Ergänzung der Tabellen noch bemerken will.

Auf das Verhalten der Reflexe gehe ich hier nicht noch einmal näher ein, da darüber alles Nötige, teils in den Tabellen, teils in dem sie einleitenden Teile des Textes schon gesagt ist, worauf ich hier verweise.

Aber zweierlei muß ich hier noch einmal besonders erwähnen, zwei Tatsachen, die für die Veronalvergiftung geradezu pathognomonisch zu sein schienen, 1. die bei den Fleischfressern vor Eintritt des Komas und während seines ersten Stadiums eintretenden, später erlöschenden, vor der Erholung sich aber wieder einstellenden, z. T. ganz furchtbaren krampfhaften Erscheinungen, teils tetanischer, teils klonischer Natur, 2. einen charakteristischen Obduktionsbefund im Gebiete des Respirationsapparates.

Zunächst möchte ich über die Krämpfe einige Worte sagen. Beim Kaninchen sah ich sie nie ausgeprägt. Dagegen oft, ja fast stets — wenigstens andeutungsweise — bei Katze und Hund. Wo sie bei Katze und Hund fehlen, tritt wenigstens eine erheblich gesteigerte Reflexerregbarkeit an ihre Stelle. Ganz besonders deutlich waren sie in den Versuchen Nr. 4, 5, 6, 23, 25, 26, 27 zu sehen, z. T. gesteigert bis zum Tetanus, der in Versuch 27 ununterbrochen durch mehr als 18 Minuten anhält, wobei das Tier ständig in größter Gefahr

war zu ersticken. In den übrigen Versuchen am Fleischfresser waren die Erscheinungen nicht so stürmisch, doch bestand deutlich eine Übererregbarkeit, von maximal gesteigerter Reflexerregbarkeit bis zu klonischen Zuckungen. Andeutungen dieser gesteigerten Erregbarkeit finden sich übrigens auch bei einigen Kaninchen und bei den Versuchen Nr. 14, 15, 19, 20, 30, (Frösche).

Bei sehr großen Gaben, wie in Versuch 24 (s. o.) können diese Exzitationsstadien gänzlich fehlen. Offenbar tritt hier die Narkose infolge der hohen Dosis zu schnell ein. Auch Versuch 29 scheint hierher zu gehören.

Die Frösche in Versuch 20 und 30 — Winterfrösche — sind zwecks Beschleunigung der Resorption der Veronallösung 60 Stunden in trockener Zimmerluft bei ca. 20 bis 25° C gehalten worden, ohne Fütterung, ohne viel Wasser (nur so viel als eben zur Hautatmung nötig war).

Über die nähere Ursache der bei den Fleischfressern beobachteten Krämpfe möchte ich mich nicht äußern. Dazu bedürfte es noch eingehenderer Untersuchungen. Doch ist hier der Platz, auf die Arbeit von Sigmund Fränkel[1]) zu verweisen. Ob seine Deutung richtig ist, lasse ich dahingestellt. Beim Kaninchen findet sich als Analogon zu den Krämpfen der Fleischfresser eigentlich nur das Zähneknirschen (siehe Tabellen).

Zu den Versuchen Nr. 7, 8, 12, 17, 18, 21, 22 brauche ich wohl nicht viel mehr zu sagen. Die Veronaldosis wurde so klein gewählt, um in diesen Versuchen, bei denen es ja lediglich auf die Beeinflussung der durch den Wärmestich hervorgerufenen Temperatursteigerung ankam, nicht durch Abkühlung getäuscht zu werden, die bei Kaninchen bekanntlich schon eintritt nach nur kurzdauernder Seiten- oder Bauchlage (z. B. infolge Veronalwirkung durch Parese der Hinterbeine).

Jetzt noch einige Worte über den Sektionsbefund. In Übereinstimmung mit dem in den Fällen von akuter Veronalvergiftung am Menschen so oft erhobenen Befund (teils klinisch, teils pathologisch-

---

[1]) Über die pharmakologische Bedeutung der bigeminierten Äthylgruppen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Supplem.-Bd. 1908 (Schmiedeberg-Festschrift), 181 ff.

anatomisch) fanden sich — wie aus den Tabellen hervorgeht, bei den meisten an der Vergiftung gestorbenen Tieren fast durchweg charakteristische Veränderungen am Respirationsapparat, besonders der Lungen, doch auch der Bronchien, der Trachea, des Larynx.

Die Lungenveränderungen wiesen — in größeren und kleineren, z. T. konfluierenden Herden alle Merkmale der hypostatischen, bzw. katarrhalischen oder Aspirations-Pneumonie auf, ganz besonders natürlich in den Lungenlappen derjenigen Seite, auf der das Tier lag. (Näheres s. Tabellen). In Larynx, Trachea und Bronchien fanden sich in all diesen Fällen (1, 4, 9, 26, 28, 29) sowie in den Kontrollversuchen (1 u. 2) Schleim, ferner zwischen den Knorpelringen starke arterielle Gefäßinjektion. In Versuch Nr. 24 (s. o., Text) fand sich nichts von all diesen Veränderungen. Die in einigen Sektionsberichten der Tabellen erwähnten Ecchymosen der Magenschleimhaut (gegenüber der Speiseröhrenmündung) sind wohl auf direkte Läsion der Schleimhaut durch das Anstoßen der Spitze des Magenschlauches zurückzuführen, wofür die Lokalisation spricht. Auffällig war in Versuch Nr. 24 die ausgeprägte streifenförmige Hyperämie der Duodenalschleimhaut. Daß die erwähnten Lungenveränderungen sich zwar in allen langsamer verlaufenden Vergiftungen finden, dagegen nicht in schnell verlaufenden (Versuch Nr. 24), stimmt mit den beim Menschen erhobenen Befunden überein. Auch hier hat man diese hypostatischen, bzw. katarrhalischen oder Aspirationspneumonien bei Veronalvergiftungen — teils klinisch, teils klinisch und pathologisch-anatomisch — festgestellt. Ja man muß (wenigstens in einigen Fällen) diesen Lungenveränderungen mehr als der spezifischen Giftwirkung des Veronals auf das Zentralnervensystem die Schuld am Tode zuschreiben, besonders in den Fällen, wo mehr als 2 Tage bis zum Eintritt des Todes vergingen. Diese Pneumonien müssen wir als mittelbare Folge der Veronalvergiftung ansehen. Da in dem durch das Veronal hervorgerufenen Koma die Atemtätigkeit — wie aus den Ziffern der Tabellen für Frequenz und Tiefe der Atemzüge hervorgeht — stark geschädigt, der Husten- und Niesreflex bedeutend herabgesetzt oder sogar ganz aufgehoben ist, so findet nicht nur ungenügende oder keine Expektoration normalen Sekretes, sondern Aspiration von Speichel statt. Es scheint auch fast, als ob unter dem Einflusse des Veronals überhaupt eine Vermehrung der normalen Sekretion der Speicheldrüsen sowohl als auch der Schleimhäute der Luftwege einträte. Dafür spricht vor allem das besonders bei den Katzenversuchen so oft beobachtete bald nach der Applikation des Giftes eintretende Lecken der Nase, die Salivation, das Niesen (in Versuch Nr. 4 z. B. 10 Minuten post applicat.) vor Eintritt des Komas (siehe Tabellen).

Nachzutragen bleibt nun noch Versuch Nr. 16, ein Blutdruckversuch.

Er wird der besseren Übersicht wegen in der folgenden Tabelle registriert.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche.	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectal-temperatur in Grad C	Bemerkungen
16. Katze, 2,23 kg, 20. II. 08. 12^{20}. 0,781 g Veronal, gelöst in 100 ccm H_2O von ca. 45° C per Magenschlauch, = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Atmung: 160 pro Minute Puls: 160 pro Minute Rektaltemp.: 39,1° C (s. Kurve)	12^{22}	191	—	—	—	Atmung kleiner, irregulär
	12^{29}	201	—	—	—	—
	12^{30}	—	—	—	—	Starke Unruhe, die zirka 13 Minuten anhält. Dabei schwankt die Größe d. In- u. Exspiration und — ihnen entsprechend — der Blutdruck hin und her. Das Tier wirft sich in Krämpfen auf dem Brett hin und her. Die Atmung ist 12^{50} schon sehr klein
	12^{34}	beginnt zu sink.	—	—	—	
	12^{50}	133—134	132	18	—	
	1^{15}	149—150	141	7	34,2	Die geringe Steigerung des Blutdruckes ist wohl als Folge des durch Einlegen des Thermometers bedingten Reizes anzusehen
	1^{22}	sinkt wieder	—	—	—	
	1^{27}	110	—	—	—	
	1^{33}	178	—	—	33,7	Dem Tier wird die Luftzufuhr abgeschnitten. Daher Druckanstieg
	—	—	—	—	—	Nach Freigabe der Luftzufuhr sinkt der Blutdruck wieder, steigt nach Kneifen in den Schwanz auf 127 mm Hg, sinkt dann wieder
	1^{38}	115	—	—	—	
	1^{50}	—	—	—	$< 33{,}5$	
	1^{55}	87	—	—	—	

Jetzt beginnt eine höchst merkwürdige Erscheinung sich zu zeigen, nämlich eine sehr auffällige Periodizität im Hin- und Her- bzw. Auf- und Niederschwanken des Blutdruckes, ohne ersichtliche Ursache, ganz spontan. Der Druck schwankt in den nächsten 5 Minuten zwischen 112 mm im Mittel und 151 mm im Mittel etwa $7^1/_2$mal auf und ab. Von Gipfel zu Gipfel sind etwa 40 Sekunden, ebenso von Tal zu Tal. Jeder Wellenberg umfaßt 3 kleine, den Atemphasen entsprechende Perioden (zusammen = etwa 20 Sekunden), ebenso jedes Wellental. Die Pulsfrequenz beträgt 120 pro Minute, die Atemfrequenz 10. Eine große Periode (1 Wellental + 1 Wellenberg)

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	Bemerkungen
16. Fortsetzung	3⁰⁰	92	—	—	—	Aufhören der Periodizität des Blutdruckes
	4⁰⁰	—	80	6	30,0	Atmung wird allmählich immer flacher
	4¹⁵	—	—	—	29,7	
	4¹⁷	—	—	—	—	Luftzufuhr wird von neuem abgeschnitten, diesmal folgt jedoch kein Anstieg des Blutdruckes
	4²⁵	—	74	—	—	—
	4⁴⁰	—	—	—	27,1	—
	4⁵²	steigt von 81 auf 134	—	Atmung sistiert völlig	—	Kompression d. Bauchaorta. Blutdruck steigt, nach Aufhören d. Kompression sinkt er wieder (auf 72 mm Hg)
	—	72				
	4⁵³	steigt auf 179 nach Aufhören der Aortenkompression 77	—	—	—	Zweite, längere Kompression d. Bauchaorta. Druck steigt. Er sinkt nach Aufhören d. Kompression akut auf 77 mm
	4⁵⁴	steigt auf 141 im Mittel (147 maximal). Dann allmähliches Absinken auf 72		Atmung setzt spontan wieder ein		Jetzt setzt die Atmung spontan wieder ein, der Blutdruck steigt spontan, sinkt aber dann allmählich wieder ab
	5⁰⁰	s. Bemerkungen	—	—	—	Harn abgedrückt. Dies macht Wiederansteigen des Blutdruckes, Tieferwerden der Atmung
	5⁰³	do.	—	—	—	Aufhören des Druckes auf die Blase. Der Blutdruck bleibt noch kurze Zeit hoch
	5⁰⁵	137 (maximal 160)	89 Vaguspulse	10 viel tiefer als vorher	—	Ausgesprochene Vaguspulse
	5¹⁰	steigt nicht wesentlich	—	—	—	Erneute Kompression der Bauchaorta
	5¹³	—	—	—	28	
	5¹⁵	sinkt allmählich	—	—	—	Erwärmung d. Tieres durch eine über seinem Bauche angebrachte Glühlampe
	5¹⁷	—	—	—	—	Kneifen in den Schwanz, Kitzeln in der Nase erfolglos
	5²⁰	—	—	—	28,3	
	5²³	78				

Lfde. Nr. Tierart, Tiergew. in Kilogramm, Datum, Zeit u. Anordnung d. Versuches. Normal. Verhalten vor dem Versuche	Zeit nach der Applikation	(Mittlerer) Blutdruck in Millimeter Hg	Pulsfrequenz pro Minute	Atemfrequenz pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	Bemerkungen
16. Fortsetzung	5^{24}	steigt auf 195,	—	—	—	Wieder Luft abgeschnitten.
	—	sinkt dann auf 79	—	sistiert	—	Blutdruck steigt. Nach Aufhören der Erstickung Absinken
	5^{33}	121	—	—	—	Künstliche Atmung m. Luft. Danach Selbstatmung m. O_2
	5^{36}	—	—	Spontanatmung. 11 mit O_2	—	Wieder Luftatmung spont. Entschied. tiefer. Spontanatmung mit O_2. Von 5^{40} an wieder periodisches Schwanken des Blutdruckes, das nach Entfernung des O_2 aufhört
	5^{40}	von jetzt ab	75	7		
	5^{41}	wied. periodisch, nach Entfernung des O_2 nicht mehr		*		
	5^{48}	—	—	—	—	Bauchhöhle eröffnet
	5^{50}	steigt infolge Betasten d. Netzes, steigt weiter auf Nebennierenreiz.	—	—	28,7	
	5^{55}		—	—	—	Verblutenlassen des Tieres durch Durchschneiden der Bauchaorta

umfaßt so etwa 6 kleine den Atemphasen entsprechende Perioden, und dauert etwa 40 Sekunden. Diese (zunächst ziemlich ungleich) großen Perioden werden schon nach Ablauf von 5 Minuten nach Beginn der Periodizität überhaupt allmählich immer weiter bis zu einer maximalen Entfernung zweier Bergmitten von $3^1/_2$ Minuten bei einer Breite des Tals von 3 Minuten 10 Sekunden. Die Berge umfassen auch hier 2 bis 3, die Täler dagegen 16 bis 20 kleine, den Atemphasen entsprechende Perioden. Dabei beträgt die Pulsfrequenz 94 pro Minute, die Atemfrequenz 6 pro Minute, der mittlere Blutdruck im Tale 92 mm, im Berge 110 mm Hg.

Dieses eigentümliche periodische Hin- und Herschwanken des Blutdruckes erinnert stark an das spontane Hin- und Herschwanken der Weite der Pupille bei der Katze in Versuch 4, wie es in Spalte 4, 11^{36} notiert ist. Ich werde hierauf nach vollständiger Beschreibung des Falles noch einmal zurückkommen.

Die Periodizität hält im ganzen bis 3^{00} nachm. an, d. h. also etwas mehr als 1 Stunde. Von 3^{00} ab hört die Periodizität auf, und es bleiben lediglich noch die gewöhnlichen, den Atemphasen entsprechenden Druckschwankungen. Der Blutdruck hält sich nur 1 Stunde lang auf der mittleren Höhe von 92 mm Hg.

Die oben erwähnte merkwürdige Erscheinung der Blutdruckschwankungen macht im Verein mit den in Fall 4 erwähnten spontanen Schwankungen der Pupillenweite folgende Erklärung wahrscheinlich: Man könnte sich vorstellen, daß dieses Schwanken des Blutdruckes zustande käme durch ein starkes Hin- und Herschwanken in der Weite der Bauchgefäße. Es würde sich also um einen direkten Einfluß des Veronals auf die glatte, bzw. Gefäßmuskulatur, oder die Nerven dieser Gefäße, bzw. dieser glatten Muskulatur handeln. Hier ist auch an die in Versuch Nr. 2, Spalte 4, 8^{00}, erwähnte, durch die Bauchdecken hindurch sichtbare, gesteigerte Darmperistaltik zu erinnern!

Das Aufhören der Periodizität scheint auf eine komplette Lähmung der Bauchgefäße hinzudeuten, das Wiederauftreten nach O_2-Atmung auf eine partielle Erholung, die indessen möglicherweise schon eingeleitet worden war durch die langdauernde Kompression der Bauchaorta (s. o. 4^{53}). Denn selbst nach Aufhören der Kompression und darauf folgendem momentanem Druckabfall steigt der Blutdruck erheblich spontan, und die Atmung wird besser. Auch dieser günstige Einfluß der Bauchaorta-Kompression scheint die obige Annahme einer Lähmung der Muskulatur bzw. der Nerven der Bauchgefäße durch das Veronal zu bestätigen. Denn als primäre Wirkung dieser Kompression könnte man sich vorstellen eine direkte, rein mechanische Entlastung der Bauchgefäße von der Last des Blutes, zweitens aber auch infolge der durch die Kompression bedingten vermehrten Füllung des Herzens eine bessere Ernährung des Zentralnervensystems, vor allem des Atemzentrums.

Als praktische Gesichtspunkte ergeben sich aus diesen Versuchen folgende:

1. Das Veronal ist bei weitem giftiger, als bisher angenommen wurde (für Kaninchen und Katzen 3 bis 4mal, für Hunde 2 bis $2^1/_2$mal giftiger). Es ist also ratsam, es dem

Handverkaufe völlig zu entziehen, es auch nicht „ad libitum" zu repetieren.

2. Das Veronal ist geradezu kontraindiziert bei allen Erkrankungen, die an sich mit Schädigungen der Gefäßfunktionen einhergehen (z. B. bei Typhus abdominalis usw.) wegen seiner Wirkung auf die Bauchgefäße.

In etwaigen Vergiftungsfällen bestände die Therapie in geeigneter Belastung des Bauches und dadurch bedingter, wenigstens partieller Kompression der Bauchgefäße bzw. Bauchaorta, außerdem in O_2-Atmung.[1]) Angezeigt erscheint noch möglichstes Warmhalten des Patienten, um zu starkes Absinken der Eigenwärme zu verhindern bzw. einigermaßen auszugleichen.

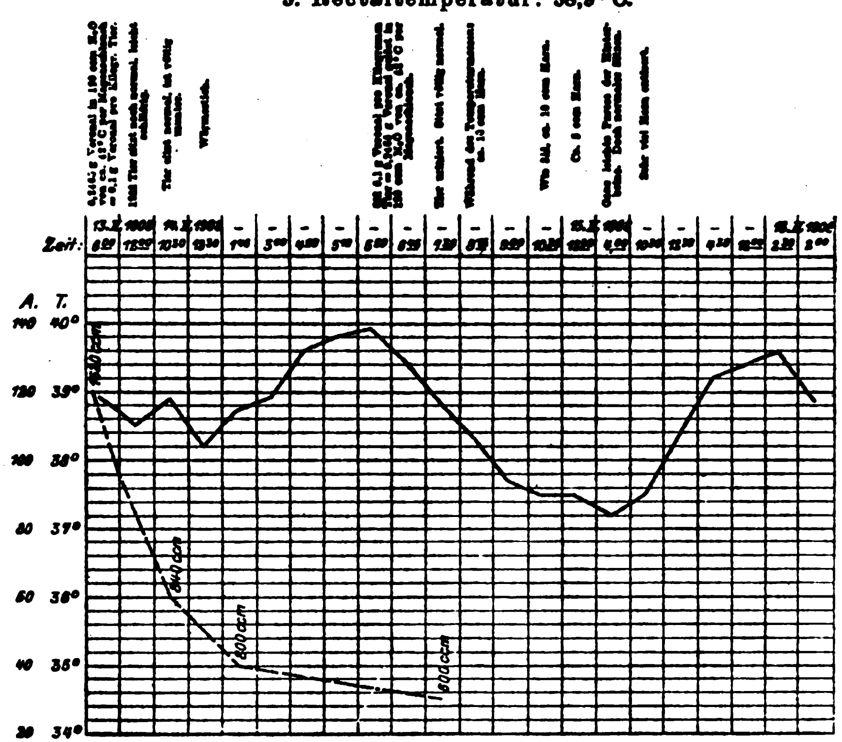
Die Zeiten sind in den Tabellen genau so bezeichnet wie in Eisenbahn-Fahrplänen. Es heißt also: $6^{\underline{00}}$ sechs Uhr abends, 6^{00} sechs Uhr morgens. Die Minutenziffern der Nacht ($6^{\underline{00}}$ bis 6^{00}) sind also unterstrichen.

Herrn Geheimrat Jacobj sage ich für sein freundliches Interesse und seine liebenswürdige Unterstützung, die er mir bei dieser Arbeit zuteil werden ließ, meinen verbindlichsten Dank.

---

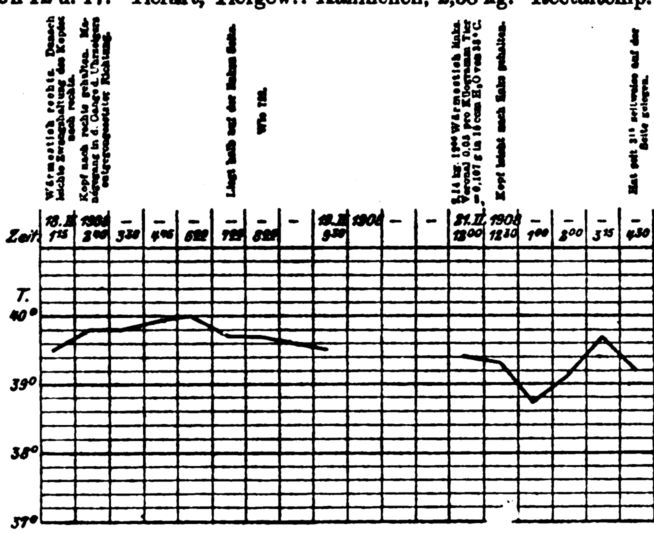
[1]) Abgesehen natürlich von Magenspülungen usw. in ganz frischen Fällen.

Versuch 7 und 8. Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,465 kg.
1. Atmung: 120 pro Minute = 1620 ccm. 2. Puls: 200 pro Minute.
3. Rectaltemperatur: 38,9° C.



Am 18. II. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: Kein wesentlicher Befund (auch mit Ausnahme der Zerstörungen durch den Wärmestich im Gehirn nicht!) außer starker arterieller Hyperämie der Trachea und der Bronchien.

Versuch 12 u. 17. Tierart, Tiergew.: Kaninchen, 2,58 kg. Rectaltemp.: 39,5° C.

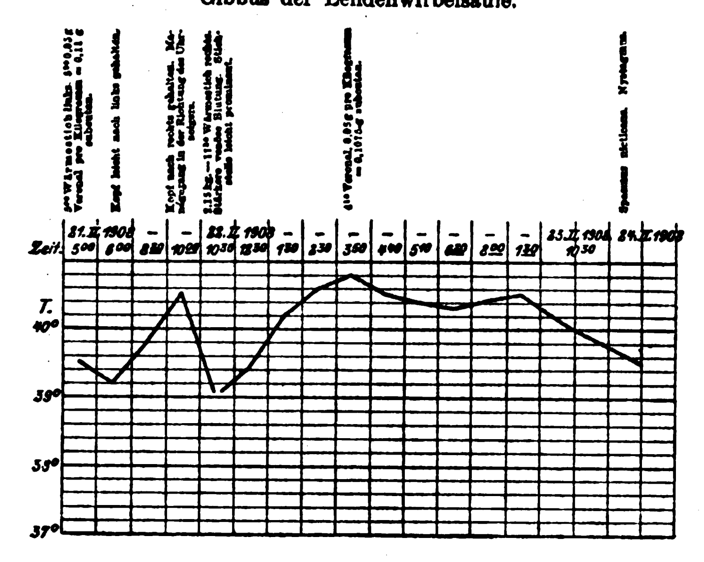


Versuch 18 und 21.

Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,2 kg.

Rectaltemperatur: 39,5° C.

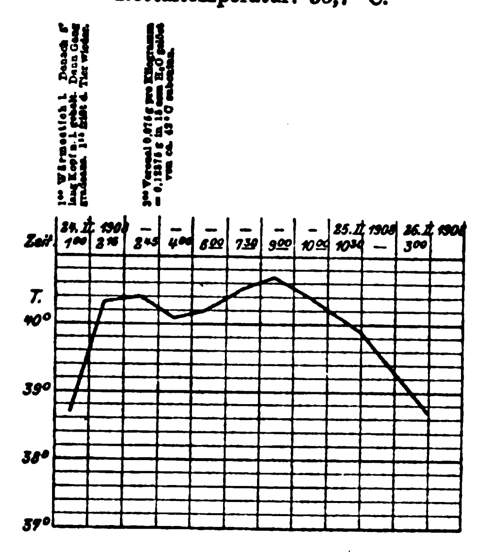
Gibbus der Lendenwirbelsäule.



Versuch 22.

Tierart, Tiergewicht: Kaninchen, 2,25 kg.

Rectaltemperatur: 38,7° C.



Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm — 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche — Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung (pro Minute)	Puls (pro Minute)	Rectaltemp. in Grad C	
1. Kaninchen, 3,5 kg 1. Atmung: 120 p' = 1920 ccm 2. T. 39,1 12. II. 08 5^{50} 1,225 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 12. II.	6^{30}	Seitenlage ertragen, Reflexe erhalten	—	—	—	13. II. 08 8^{00} tot vorgefunden. Sektion: In der Magenschleimhaut an der großen Curvatur gegenüber der Einmündungsstelle des Ösophagus einige (wohl durch die Spitze d. Magenschlauches verursachte) Ecchymosen. Duodenum frei. Larynx hyperämisch. Darin etwas Schleim. Zwischen den Trachealringen starke arterielle Gefäßinjektion. Lunge o. B.
		8^{00}	Schmerzleitung erhalten, Reflexe erhalten, Lichtreaktion der Pupillen etwas träge. Fester Schlaf.	50 p' = 900 ccm	240 p'	37,1	
		9^{45}	Tiefer Schlaf. Trachealrasseln, Zähneknirschen	—	—	—	
	13. II.	2^{00}	Tiefer Schlaf. Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Trachealrasseln. Pupillen wie oben. Schmerzleitung sehr stark verlangsamt, fast aufgehoben	40 p' = 640 ccm	244 p'	36,8	
		8^{00}	Tot vorgefunden	—	—	—	
2. Kaninchen, 2,87 kg 1. Atmung: 120 p' = 1800 ccm 2. T. 38,7 12. II. 08 6^{00} 0,7175 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	12. II.	6^{30}	Seitenlage ertragen, Reflexe erhalten	—	—	—	Nach 10 Tagen noch immer weithin hörbares Rasseln. Deutliche Bronchitis. Im übrigen erscheint d. Tier völlig normal, frißt m. Appetit usw. Schließlich kompl. Heilung
		8^{00}	Schläft fest. Schmerzleitung erhalten, starke Darmperistaltik, durch die Bauchdecken hindurch brillant sichtbar. Lichtreaktion der Pupillen etwas träge	50 p' = 1150 ccm	232 p'	37,5	
	13. II.	2^{00}	Tiefer Schlaf. Trachealrasseln, Zähneknirschen, beides weithin hörbar. Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Pupillenreaktion auf Licht etwas träge. Schmerzleitung stark verlangsamt, beinahe aufgehoben	100 p' = 850 ccm	228 p' irregul., inäqual.	36,7	

			artige Atemstöße. Schmerzleitung stark verlangsamt (s. o.). Pupillen wie oben. Trachealrasseln	= 1380 ccm			
		3^{30}	Schläft noch, noch Trachealrasseln. Befund unverändert	120 p′ = 1560 ccm	280 p′	38,5	
		12^{00}	Das Tier ist erwacht, sitzt, wenn auch infolge Parese der Hinterbeine noch unvollkommen	—	—	38,5	
	14. II.	10^{30}	Tier sitzt normal, putzt sich, frißt Kot, erscheint völlig munter. Doch noch immer Trachealrasseln	120 p′ = 1080 ccm	240 p′	38,8	
3. Kaninchen, 2,47 kg	12. II.	7^{00}	Parese der Hinterbeine	—	—	—	
1. Atmung: 120 p′ = 1320 ccm		8^{00}	Wie 7^{00}.	—	—	—	
2. T. 39,1		8^{45}	Tier schläft. Seitenlage. Prompte Lichtreaktion der Pupillen	75 p′ = 1012 ccm	200 p′	38,3	Heilung
12. II. 08 5^{45} 0.494 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 40 bis 42° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	13. II.	2^{00}	Status idem. Nur ist die Pupillenreaktion auf Licht träge geworden. Kein Trachealrasseln, kein Zähneknirschen. Schmerzleitung verlangsamt	50 p′ = 700 ccm	228 p′ irregul., inäqual.	37,5	
		10^{30}	Status idem. Pupillen lichtstarr, Cornealreflex erhalten	60 p′ = 900 ccm	240 p′	37,2	
		3^{30}	Das Tier ist erwacht, sitzt normal, ist völlig munter, frißt. Die Pupillen reagieren. Kein Trachealrasseln	—	—	—	
4. Katze, graugelb, 2,945 kg	14. II.	11^{30}	Das Tier ist deutlich trunken, sehr aufgeregt, taumelt lebhaft im Käfig hin und her, ist außerstande, sich auf den Beinen zu halten. Parese aller 4 Extremitäten, der hinteren > der vorderen	—	—	—	17. II. 08 früh tot vorgefunden.
1. Atmung: 20 p′ = 680 ccm		11^{33}	Nach Anfassen am Nackenfell reflektorischer Opistotonus. Tier erträgt Seitenlage. Pupillen maximal erweitert, kreisrund, völlig lichtstarr	—	—	—	Sektion: Tier noch warm. Totenstarre. Ecchymosen im Magen an der großen Curvatur gegenüber d. Einmündungsstelle d. Ösophagus. Im Larynx etwas schleim.-eitriges Sekret. Larynx und
2. T. 38,3 14.II.08 11^{10} 1,0325 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier		11^{36}	Pupillen reagieren wieder, wenn auch sehr träge. Dagegen schwankt ihre Weite spontan in sehr weiten Grenzen lebhaft hin und her. Zeitweise spontaner Opistotonus — meist nach rechts besonders stark ausgeprägt. Tier schließt die Augen. Hustenartige Atemstöße	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 19.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm — 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche — Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
4. Fortsetzung	1908 14. II.	11^{40}	Starker Erschütterungsreflex des jetzt ruhigen Tieres, das inzwischen auf den Tisch gelegt worden war. Starkes Zucken nach Schlag auf den Tisch. Das Tier leckt beständig seine Nase, Salivation	ca. 30 bis 35 p′	—	—	Trachea nicht so deutl. hyperämisch wie etwa in Fall 1. In der rechten Lunge viele größ. u. kleinere blaurote, derbere Stellen, innerhalb deren d. Alveolen luftleer sind. Daneben lufthaltiges Lungengewebe. (Das Tier lag auf der rechten Seite.) In der linken Lunge auch solche Herde wie rechts, doch weniger u. kleinere. — In den Bronchien reichl. dünnflüssig-schleimig-sanguinolent. Sekret
		11^{45}	Tremor und Spasmen in den Extremitäten. Ohrmuschelreflex (Wippen der Ohrmuschel nach Kitzeln bzw. Berührung der Haarspitzen an der Innenfläche der Muschel) äußerst lebhaft. Schmerzleitung verlangsamt	—	—	—	
		11^{50}	Schwimm- und Tretbewegungen	—	—	—	
		12^{00}	Tier läßt die Zunge teilweise aus dem Maule heraushängen	—	232 p′	—	
		12^{10}	—	—	—	37,3	
		12^{35}	Trismus	30 p′ = 720 ccm	—	—	
		12^{40}	Reflexe schwächer. Zunge hängt weit aus dem leicht geöffneten Maule heraus	—	—	—	
		12^{45}	Unterkiefer hängt schlaff herab. Schmerzleitung (nach Kneifen in den Schwanz) stark verlangsamt. Schlaf	16 p′	—	—	
		1^{15}	Pupillen maximal verengt, strichförmig, und völlig reaktionslos. Corneal-, Ohrmuschel- und Erschütterungsreflex = 0. Lidreflex (s. Text) erhalten. Koma	14 p′ = 120 ccm	—	35,0	Dura mater z. T. dem Schädeldache fest adhärent
		1^{50}	Lidreflex noch erhalten	8 p′	126 p′	—	Im Harn fand sich weder Eiweiß noch Zucker
		2^{05}	Lidreflex abgeschwächt	—	—	—	
		3^{45}	Lidreflex eben noch auslösbar, Schnurrhaarreflex (s. Text) auf mäßigen Reiz noch deutlich	6 p′	102 p′	—	

		5^{00}	Serie von Hustenstößen. Danach Lidreflex wieder leichter auslösbar. Niesreflex — durch Kitzeln in der Nase mit einer Feder — nur schwer zu erhalten	—	—	—	
		7^{00}	—	4 p'	84 p'	<33,5	
	15. II.	12^{00}	Koma unverändert. O_2 gegeben, 3 l pro Minute. Danach sinkt die Atemfrequenz bald auf 6 pro Minute, steigt indessen bald wieder auf 8 p'. Harn abgedrückt. Danach Erschütterungsreflex besser als vorher auslösbar. Vorder- u. Hinterbeinreflex besser. Atmung etwas tiefer, einzelne Hustenstöße. Trachealrasseln	8 p' 6 p' 8 p'	—	—	
		2^{00}	$^1/_2$ Stde. lang künstliche Atmung gemacht. Danach Anstieg der Temp. von 24,6 auf 26,0° C, der Niesreflex ist leichter auslösbar. Trachealrasseln. Durch Auslösen von Niesen u. Hustenstößen (durch Kitzeln in der Nase) wird Schleim aus Nase und Trachea herausbefördert. — Das Tier wird zugedeckt	6 bis 8 p'	—	24,6 26,0	
		4^{30}	Ohrmuschelreflex angedeutet. Schmerzleitung desgl. Pupillen etwas weiter, reichl. klonische Zuckungen	16 p'	—	36,2	
	16. II.	12^{30}	Trachealrasseln, Reflexe erloschen	32 p'	—	—	
		2^{30}	„ „ „	52 p'	—	—	
		11^{00}	Reflexe z. T. wieder auslösbar, Trachealrasseln. Bronchitische Geräusche. Hält man das Tier an den Hinterbeinen, mit dem Kopfe nach unten hängend, so fließt etwas schleimig-eitriges Sekret aus dem Maule	60 p'	—	34,6	
		8^{00}	—	72 p'	—	32,0	
	17. II.		Früh tot vorgefunden				
5. Katze, schwarz, 2,59 kg 1. Atmung: 40 pro Minute = 1160 ccm	14. II.	3^{45}	Pupillen deutlich enger, als sogleich post applicationem	—	—	—	17. II. 08 komplette Heilung
		4^{20}	Tier kann nicht mehr sitzen, Parese besonders der Hinterbeine. Das Tier reagiert aber noch auf Anruf, schnurrt, wenn es gestreichelt wird. Er-	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 21.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm — 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche — Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
5. (Fortsetzung) 2. T. 38,8 14. II. 08 3^{30} 0,6475 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 14. II.		schütterungsreflex sehr lebhaft. Pupillen reagieren prompt auf Licht				s. vorige Seite
		4^{40}	Schlaf. Augen nicht völlig — nur ca. halb — geschlossen. Erschütterungsreflex herabgesetzt, ebenso Ohrmuschelreflex. Lidreflex noch lebhaft. Schmerzleitung erhalten	—	—	—	
		5^{20}	Schmerzleitung noch prompt	30 p' = 555 ccm	—	36,1	
		6^{00}	Koma. Pupillen maximal verengt, strichförmig, völlig lichtstarr. Niesreflex kaum noch auszulösen. Corneal-Ohrmuschelreflex erloschen, Schnurrhaarreflex deutlich. Schmerzleitung stark verlangsamt	—	—	—	
		7^{10}	Pupillen sind weiter als 6^{00}, reagieren auf Licht. Das Tier leckt sich die Nase. Salivation. Klonische Zuckungen am ganzen Körper. Das Tier hustet zuweilen	20 p' = 400 ccm	—	33,6	
		8^{15}	Pupillen reagieren. Alle Reflexe vorhanden, und zwar gesteigert. Schmerzleitung prompt. Starke Salivation	—	—	<33,5	
	15. II.	12^{30}	Enorme Reflexsteigerung, auch gegen Schall. Pupillen weit, reagieren prompt. Starke Jaktationen, Schwimm- u. Tretbewegungen. Noch Narkose	—	—	—	
		11^{45}	Starke Jaktationen, Opistotonus, Schwimmbewegungen, Pupillen stark verengt, fast strichförmig	—	—	—	
		12^{10}	Nach einem vergeblichen Versuch, Harn durch Abdrücken zu gewinnen, werden die Pupillen weiter, das Tier versucht, sich aufzurichten, faucht. Nach weiterer Bauchmassage kräftige Spontanbewegungen der Beine. Plötzlich allgemeiner	28 p'			

			Tetanus, Pupillen weit, starr. Nach Abklingen des Tetanus (nach ca. 30″) Pupillen eng. Tier bewußtlos				
		1^{00}	—	—	—	37,7	
		1^{15}	Klonische Krämpfe	—	—	—	
		4^{40}	Noch immer zeitweise Krämpfe. Noch bewußtlos	—	—	—	
	16. II.	12^{30}	Noch zuweilen Opistotonus. Tier reagiert spurweise auf Anruf	—	—	—	
		6^{00}	Tier hebt spontan den Kopf, liegt noch in Seitenlage, reagiert jetzt prompt auf Anruf. Extremitäten noch immer ataktisch, paretisch	—	—	—	
		2^{00}	Tier sitzt, schnurrt. Noch leichte Ataxie der Hinterbeine	—	—	38,2	
		8^{00}	do.	—	—	38,5	
	17. II.		Tier völlig normal				
6. Katze, weißbunt, 1,415 kg 1. Atmung: 33 p′ = 833 ccm 2. T. 39,1 15. II. 08 4^{00} 0,283 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 38° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	15. II.	4^{20}	Beginnende Unsicherheit im Gehen und Stehen, besonders der Hinterbeine	—	—	—	16. II. 08 abends 8^{00} komplette Heilung (nach 16 Stdn.)
		4^{30}	Seitenlage. Das Tier ist nicht zu bewegen, aufzustehen	—	—	—	
		5^{00}	Hier und da krampfhafte Zuckungen, Opistotonus, Spasmen der Beine. Erschütterungsreflex gesteigert. Pupillen weit, reagieren prompt auf Licht. Cornealreflex gesteigert, ebenso Lid- und Ohrmuschelreflex lebhaft	—	—	—	
		5^{15}	Tret- und Schwimmbewegungen. Jaktationen	—	—	—	
	16. II.	12^{30}	Wie 15. II. 08 5^{15}	24 p′ = 480 ccm	—	37,3	
		2^{30}	Noch immer Jaktationen, Opistotonus, Tier reagiert etwas auf Anruf	—	—	37,2	
		2^{00}	Bis auf eine leichte Ataxie der Hinterbeine ist das Tier normal	—	—	37,4	
		8^{00}	Keine Ataxie mehr. Völlig normal. Sanatio	—	—	38,9	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 23.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
9. Kaninchen, 4,13 kg 1. Atmung: 60 p′ = 1470 ccm 2. T. 39,7 Tier wurde 2 Tage lang hungern gelassen (mit Maulkorb). Darauf am 17. II. 08 7^{35} 1,45 g Veronal, gelöst in 58 ccm H_2O von ca. 42° C per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier	1908 17. II.	8^{40}	Seitenlage rechts. Pupillen weit, reagieren prompt, Schmerzleitung prompt	—	—	—	18. II. 08 9^{00} tot vorgefunden. Sektion: Noch warm. Totenstarre. Schleimige Auflagerungen auf der Magenschleimhaut. Im Magen reichl. Flüssigkeit, geringe Futterreste. Lungen: Rechte L. stark hyperämisch. Alveolen an den am stärksten hyperäm. Stellen luftleer. In Trachea und Bronchien etw. Schleim, starke arterielle Gefäßinjektion zwisch. den Ringen
		9^{00}	Lebhaftes Zähneknirschen, Erschütterungsreflex lebhaft. Mäßige Jaktationen. Pupillenreaktion träger. Schmerzleitung verlangsamt. Husten, Tier liegt in festem Schlaf. Trachealrasseln. Salivation. Lid-Schnurrhaarreflex stark herabgesetzt. Bronchitische Geräusche?	50 p′ = 1000 ccm	240 p′	35,3	
	18. II.	9^{00}	Tot vorgefunden, noch warm				
10. Kaninchen, 2,26 kg 1. Atmung: 120 p′ = 1620 ccm 2. T. 38,9 2 × 24 Stdn. Hunger (Maulkorb). Danach am 17. II. 08 7^{25} 0,565 g Veronal, gelöst in 22,5 ccm H_2O [illegible]	17. II.	8^{30}	Seitenlage. Pupillen weit, reagieren kaum auf Licht. Schmerzleitung gut erhalten	—	—	—	19. II. 08 komplette Heilung
		9^{00}	Lebhaftes Zähneknirschen, Trachealrasseln, Husten. Pupillen fast lichtstarr. Schmerzleitung etwas verlangsamt. Cornealreflex abgeschwächt. Lid-Schnurrhaarreflex prompt. Spasmen in den Beinen, mäßige Jaktationen. Tiefer Schlaf. Bronchitische Geräusche	40 p′ = 560 ccm	240 p′	35,1	
		11^{00}	Krampfartige Hustenanfälle	—	—	—	
	18. II.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	—	34,5	

per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier		3[45]	Tier liegt noch. Kein Trachealrasseln mehr. Hier und da noch etwas Zähneknirschen. Gegen Hochheben an den Ohren wehrt sich das Tier energisch. Schmerzleitung gut, Reflexe normal	120 p' = 1380 ccm	—	37,7	
	19. II.	9[00]	Völlig erholt	—	—	—	
11. Kaninchen, 2,0 kg 1. Atmung: 120 p' = 1200 ccm 2. T. 39,6 2 × 24 Stdn. Hunger (Maulkorb). Danach am 17. II. 08 7[20] 0,4 g Veronal, gelöst in 16 ccm H_2O von ca. 42 bis 45° C per Magenschlauch = 0,2 g Veronal pro Kilogramm Tier	17. II.	8[20]	Seitenlage. Pupillen weit, reagieren prompt auf Licht. Schmerzleitung gut erhalten	—	—	—	19. II. 08 komplette Heilung
		9[00]	Zähneknirschen. Erschütterungsreflex deutlich gesteigert. Pupillen reagieren. Schmerzleitung gut erhalten. Trachealrasseln, Husten. Lid-Schnurrhaarreflex prompt. Jaktationen. Spasmen in den Beinen	40 p' = 560 ccm	200 p'	35,6	
	18. II.	9[00]	Noch Seitenlage, doch kein Schlaf mehr	—	—	—	
		10[00]	Tier versucht, sich aufzurichten. Noch starke Parese der Hinterbeine	—	—	—	
		3[45]	Tier sitzt mit nicht völlig untergezogenen Hinterbeinen, die noch leicht paretisch sind. Sonst munter	60 p' = 990 ccm	—	39,3	
	19. II.	früh	Völlig erholt	—	—	—	
23. Katze, 2,06 kg 1. Atmung: 20 p' = 680 ccm 2. T. 38,9 24. II. 08 12[40] 0,515 g Veronal, gelöst in 120 ccm H_2O von ca. 42° C per Magenschlauch = 0,25 g Veronal pro Kilogramm Tier	24. II.	1[00]	Seitenlage. Klonische Krämpfe, Jaktationen. Leckt sich die Nase, niest. Salivation. Tier ist sehr aufgeregt. Macht vergebliche Versuche, sich aufzusetzen. Pupillen sehr weit, reagieren prompt. Erschütterungsreflex sowie die übrigen Reflexe erheblich gesteigert	—	—	—	26. II. 08 komplette Heilung
		1[30]	Die Jaktationen sistieren. Tier schläft tief. Zunge hängt z. T. aus dem Maule. Schmerzleitung = 0. Pupillen mittelweit, reagieren. Erschütterungsreflex nicht mehr auszulösen. Ohrmuschel-, Lid- und Schnurrhaarreflex prompt	—	—	—	
		4[20]	Pupillen maximal verengt, strichförmig. Nach Einführung des Thermometers in den Anus werden die Pupillen etwas weiter. Husten	—	—	32,4	
		5[45]	Pupillen weiter. Leichte Spasmen in d. Extremitäten	—	—	—	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 25.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in Kilogramm 1. Atmung pro Minute 2. Rectaltemperatur in Grad C vor dem Versuche Datum, Zeit und Anordnung des Versuches	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung						Ausgang? (Tod? Heilung?) ev. Sektionsbefund
	Datum	Zeit	Allgemeines Verhalten Reflexe	Atmung pro Minute	Puls pro Minute	Rectaltemp. in Grad C	
23. Fortsetzung.	1908 24. II.	7[30]	Jaktationen, Hustenparoxysmen	20 p′	—	29,4	s. vorige Seite
	25. II.	10[30]	Tier sehr aufgeregt, heult laut. Schwimm- und Tretbewegungen. Opistotonus	—	—	35,9	
		7[00]	Status idem				
	26. II.	früh	Tier völlig normal	—	—	—	
25. Katze, 1,75 kg 1. Atmung: 40 p′ = 1400 ccm 2. T. 39,0 28. II. 08 4[05] 0,5925 g Veronal + 0,5925 g Na_2CO_3 in 25 ccm H_2O auf d. Wasserbade gelöst, per Magenschlauch, ca. 42° C warm = 0,35 g Veronal pro Kilogramm Tier. Bei d. Applikation gehen ca. 6 bis 8 ccm der Lösung verloren, infolge heftig. Sträubens des Tieres	28. II.	4[15]	Leichter Tremor des Kopfes	—	—	—	1. III. 08 komplette Heilung
		4[20]	Leichte Parese der Hinterbeine. Erschütterungsreflex gesteigert	—	—	—	
		4[25]	Tier sitzt noch, unsicher schwankend	—	—	—	
		4[35]	Leichte Parese der Vorderbeine	—	—	—	
		4[40]	Tier ist sehr unruhig, tobt aber nicht, hat nicht das starke Exzitationsstadium der bisherigen Katzen. Pupillen weit, reagieren	—	—	—	
		4[45]	Hier und da Spasmen in den Beinen. Opistotonus angedeutet. Erschütterungsreflex stark gesteigert. Schmerzleitung verlangsamt. Tiefer Schlaf	—	—	—	
		5[15]	Leckt sich beständig die Nase. Hustet, niest. Spontane Zuckungen. Zeitweise krampfhafte Bewegungen der Vorderbeine (spastisch-paretisch). 5[30] Stat. idem	—	—	—	
		6[30]	Nach Aufheben des Tieres am Nackenfell sehr starker, ausgeprägter Opistotonus u. teils klonische, teils tonische Krämpfe aller Extremitäten. Trismus angedeutet. Husten. Krampfhafte Atemstöße	—	—	—	

		8^{22}	Stat. idem. Pupillen etwas enger. [illegible] Stat. idem	—	—	[illegible]	
	29. II.	10^{00}	Schläft noch, ist aber, mit Mühe zwar, zu erwecken	—	—	—	
	1. III.	früh	Tier völlig munter bis auf eine leichte Parese der Hinterbeine, die aber auch im Laufe des Tages noch schwindet	—	—	—	
26. Katze, 1,26 kg 1. Atmung: 40 p' = 1040 ccm 2. T. 39.2.—28. II. 08 4^{15} 0,441 g Veronal aufgeschwemmt in 30,0 ccm 0,5%iger Tragacanth-Lösg., kalt, per Magenschlauch = 0,35 g Veronal pro kg Tier	28. II.	4^{25}	Parese der Hinterbeine	—	—	—	1. III. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: In Larynx, Trachea arter. Hyperämie. Lunge: bes. links bronchopneumon. Herde (wie in Fall 1)
		4^{30}	Tier läuft mit unkoordinierten Bewegungen taumelnd, aufgeregt im Käfig umher. Pupillen weit, reagieren prompt. Erschütterungsreflex gesteigert. Tier leckt sich beständig die Nase. Salivation	—	—	—	
		4^{35}	Seitenlage links. Schlaf				
		4^{40}	Leichter Opistotonus. Krampfhafte Bewegungen der Vorderbeine. Tier niest, leckt sich die Nase. Opistotonus durch Rupfen am Nackenfell leicht auszulösen. Pupillen weit, reagieren. Starkes Zusammenschrecken auf Schall	—	160 p'	—	
Die Katze würgt bei der Applikation ca. 5 bis 6 ccm — schätzungsweise — neben dem Schlundrohr wied. heraus, erhält also re vera nur ca. 0,3 g Veronal pro Kilogramm Tier	29. II.	10^{00}	Starker Opistotonus, klonische Krämpfe, Hustenparoxysmen. Abends status idem	—	—	34,6	
	1. III.	früh	Tot vorgefunden				
Kontrollvers. Nr. 1. Katze, 2,0 kg 24. III. 08 11^{30} 0,6 g Veronal, gelöst in 70 ccm H_2O von 42 bis 45° C per Magenschlauch = 0,3 g V. pro Kilogr. Tier	24. III.	11^{35}	Erschütterungsreflex gesteigert	—	—	—	28. III. 08 früh tot vorgefunden. Sektion: Ausgedehnte bronchopneumonische Herde bzw. Hypostasen in d. Lungen, bes. rechts, z. T. konfluierend. Die Bronchien, Trachea mit schleimig-eitrig., etwas blutigem Sekret erfüllt
		11^{50}	Sitzt eben noch, wenn auch schon stark schwankend. Fährt auf Händeklatschen stark zusammen	—	—	—	
		12^{00}	Reflexe maximal gesteigert	—	—	—	
		12^{10}	Seitenlage rechts	—	—	—	
		12^{30}	Reflexe herabgesetzt; tiefer Schlaf. Trachealrasseln. Das Koma dauert an bis 28. III. 08.	—	—	—	
	28. III.	früh	An diesem Tage morgens tot vorgefunden	—	—	—	
Kontrollvers. Nr. 2. Kaninchen, 1,79 kg 24. III. 08 11^{50} 0,537 g Veron., gel. in 70 ccm H_2O v. 42—45° C = 0,3 g V. pro 1 kg Tier	24. III.	12^{20}	Taumelt	—	—	—	25. III. 08 früh tot vorgefunden
		2^{00}	Seitenlage	—	—	—	
	25. III	früh	Tot vorgefunden	—	—	—	

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in kg Datum, Zeit u. Anordnung des Versuches	Datum	Zeit	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung
27. Foxterrierhündin, 9,5 kg	1908 29. II.	1^{30}	Parese der Hinterbeine. Tier sitzt taumelnd, jammert leise, taumelt zeitweise aufgeregt im Käfig umher
29. II. 08 1^{30} 4,275 g Veronal, gelöst in 450 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,45 g V. pro 1 kg Tier		1^{35}	Parese auch der Vorderbeine. Tier liegt in Bauchlage jammernd im Käfig, speichelt, leckt sich die Nase, hustet zeitweise
		1^{40}	Seitenlage rechts. Doch vermag sich das Tier, wenn auch unvollkommen, in Bauchlage zu drehen. Atmung 12 p′
		1^{45}	Exspiration stoßend. Leichter Opistotonus, leichte Spasmen der Vorderbeine, rechte Seitenlage
		1^{55}	Furchtbar heftiger Tetanus, der ununterbrochen bis 2^{13} dauert. Alle 4 Extremitäten sind steif ausgestreckt, besonders die vorderen, die, trotzdem das Tier in Seitenlage bleibt, hoch über den Boden gestreckt und völlig starr etwas nach hinten gehalten werden, ebenso der Schwanz. Krampfhafte, hustenstoßartige Exspirationen. Die Gelenke lassen sich nur unter Anwendung ziemlicher Kraft etwas biegen
		2^{10}	Status wie 1^{55}. Schnarchende Inspirationen, hustenstoßartige, mit Heulen verbundene Exspiration
		2^{13}	Langsames Abklingen des Tetanus beginnt
		2^{17}	Gelenke weich. — Pupillen bisher nicht zu beobachten, da Augen in vollkommener Schlafstellung
		2^{30} 2^{35}	Tier schnarcht. Exspiration stark stoßend. Atmung 33 p′, oberflächlich. Trotz Kopftieflage und Heraushängen der Zunge ist die Atmung sehr erschwert. Daher wird, um dem Tiere Luft zu schaffen, ihm ein Spundkork zwischen die Zähne geklemmt. Danach sofort Besserwerden der Atmung
		2^{40}	Atmung 22 p′, tiefer. Bald erfolgt ein weiterer Rückgang der Atemfrequenz auf ca. 13 bis 14 p′ (leicht irregulär). Dabei sind die Exspirationen ca. doppelt so lang wie die Inspirationen. Dauer einer Exspiration ca. 3″
		3^{45}	Atmung 8 p′. Biotsches Atmen. Am Ende der Apnoe gegen den Anfang der Inspiration hin starkes Zittern des Tieres, klonischen Krämpfen nicht unähnlich. Pupillen sehr eng, lichtstarr
		5^{00}	Sphincter ani völlig erschlafft, klafft weit. Rectaltemperatur 32,0° C. Atmung 8 p′. Es dauern: Exspiration + Apnoe 7″, die Apnoe allein 5″ (mit Stoppuhr gemessen)

		5^{45}	Atmung 12 p′. Von jetzt ab ziemlich ruhiger Schlaf, allmähliche Besserung. 3 × 24 Stdn. nach Beginn des Versuches ist das Tier wieder völlig munter, wenn auch etwas schwach; es frißt mit Appetit, begrüßt jeden, der es besucht, mit freudigem Gebell und Schweifwedeln
28. Hündin (Schäferhund-Bastard), 10,8 kg. 3. III. 08 11^{10} 5,94 g Veronal, gelöst in 500 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,55 g V. pro 1 kg Tier	3. III.	11^{15}	Parese der Hinterbeine
		11^{20}	Parese auch der Vorderbeine. Tier taumelt erregt im Käfig umher
		11^{25}	Bauchlage. Salivation. Tier winselt, hustet, leckt sich die Nase. Atmung 20 p′
		12^{00}	Leichte klonische Krämpfe. Hier und da Spasmen der Beine. Pupillen eng, lichtstarr, tiefer Schlaf
		12^{30}	Atmung schnarchend, rasselnd, 8 p′. Tier liegt völlig schlaff da. Koma. Keine Schmerzleitung mehr
		1^{00}	Atmung 4 bis 6 p′, etwas irregulär, inäqual
		1^{30}	Pupillen werden weiter, sind lichtstarr
		2^{00}	Exitus letalis
29. Hündin, 7,0 kg. 5. III. 08 5^{00} 3,5 g Veronal, gelöst in 350 ccm H_2O von ca. 42° C, per Magenschlauch = 0,5 g V. pro 1 kg Tier	5. III.	5^{05}	Leichte Parese d. Hinterbeine. Daher taumelnder Gang. Tier setzt sich schließlich nieder
		5^{13}	Bauchlage. Alle 4 Extremitäten paretisch. Starkes Geifern
		5^{17}	Tier ist sehr unruhig, schnauft, niest, winselt, leckt die Nase
		5^{20}	Seitenlage rechts
		5^{30}	Enorme Erregung des Tieres. Intensive Tret-, Kratz- und Schwimmbewegungen. Dabei deutliche Spasmen der Beine und der Nackenmuskulatur
		5^{35}	Jetzt starke Spasmen der Beine, wechselnd mit klonischen Krämpfen
		5^{45}	Stat. idem
			Die Vergiftung verläuft, abgesehen vom Tetanus, der hier fehlt, ganz analog Versuch 27, nur schneller. Dementsprechend sind die bei der Sektion gefundenen pathologisch-anatomischen Veränderungen besonders der Lungen weniger ausgedehnt als in Kontrollversuch Nr. 1 z. B.
	6. III.	früh	Tot gefunden
13. Ran. temporaria, 25 g. 19. II. 08 1^{14} 0,006 g Ve-	19. II.	1^{30}	Springt nur noch auf starkes Kneifen. Sonst kriecht er nur noch
		1^{40}	Hält den Kopf nicht mehr, sondern läßt ihn auf die Unterlage sinken. Aus Rückenlage vermag er sich nur sehr mühsam in Bauchlage zu drehen

Fortsetzung der Tabelle von Seite 29.

Lfde. Nr. Tierart, Tiergewicht in kg Datum, Zeit u. Anordnung des Versuches	Datum	Zeit	Verhalten des Tieres während der Dauer der Veronalwirkung
13. (Fortsetzung)	1908 19. II.	2^{00}	Erträgt Rückenlage. Dreht sich nur noch auf starkes Kneifen um. Lungenatmung sistiert. Bisher keine deutliche Reflexsteigerung. Puls 26 p′
ronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,25 g V. pro 1 kg Frosch		2^{20}	Puls 22 p′. Bei Kneifen noch kräftige Abwehrbewegungen, wenn auch etwas unbeholfen, und noch immer Umdrehen in Bauchlage aus Rückenlage auf starkes Kneifen
		3^{45}	Puls 18 p′. Sonst Stat. idem
		4^{15}	Dreht sich spontan aus Rücken- in Bauchlage um. Wieder Lungenatmung. Extremitäten noch leicht paretisch. Erträgt nicht mehr Rückenlage
		5^{05}	Erträgt zeitweise wieder Rückenlage. Deutlicher Erschütterungsreflex
		7^{00}	„ „ „ „ Reflexe schwächer
	20. II.	früh	Erholt
14. Ran. temporar., 16 g	19. II.	4^{40}	Kann sich nur noch schwer aus Rücken- in Bauchlage drehen. Kopf liegt auf der Unterlage. Extremitäten paretisch. Springt nicht mehr. Lungenatmung sistiert
19. II. 08 4^{30} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,375 g V. pro 1 kg Frosch		4^{45}	Rückenlage ertragen. Puls 28 p′
		5^{05}	Puls 24 p′
		5^{50}	Puls 22 p′
		6^{00}	Nach kräftigem Kneifen klonische Krämpfe angedeutet. Erschütterungsreflex erhöht. Stoß auf die Extremitätenknochen führt zu tetanischem Krampf der Muskeln der betr. Extremität. Starke Reflexerregbarkeit auf taktile Reize
	20. II.	früh	Erholt
15. Ran. esculent., 26 g	19. II.	6^{30}	Leichte Parese der Beine
19. II. 08 6^{00} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,23 g V. pro 1 kg Frosch		6^{45}	Erträgt zeitweise Rückenlage. Reflexe erhöht. Parese der hinteren Extremitäten > die der vorderen
		7^{30}	Vermag noch, wenn auch mühsam, sich aus Rücken- in Bauchlage zu drehen
		7^{45}	Kann sich nicht mehr aus Rückenlage befreien

	20. II.	abds.	Erholt
19. Ran. esculent., 27 g. 19. II. 08 6^{18} 0,012 g Veronal, gelöst in 2,0 ccm H_2O. Je 1 ccm in Bauch- u. 1 Seitenlymphsack = 0,44 g V. pro 1 kg Frosch	19. II.	6^{22}	Lungenatmung sistiert. Vorher sehr lebhaft, springt der Frosch jetzt nur noch auf starke Reize
		6^{25}	Rückenlage ertragen. Reflex nach Berührung der Sohlen gesteigert. Desgl. Erschütterungsreflex
		6^{35}	Zuckungen der Beine. Hinterbeine krampfhaft angezogen, Vorderbeine halb nach oben und vorn gestreckt. Puls 26 p'
	21. II.	abds.	Völlig erholt
20. Ran. esculent., 20 g, 60 Std. trocken gehalten, unter Glasglocke bei 20° C. 22. II. 08 10^{55} 0,006 g Veronal, gelöst in 1,0 ccm H_2O, Bauchlymphsack = 0,3 g V. pro 1 kg Frosch	22. II.	11^{40}	Erträgt Rückenlage. Reflexe gesteigert
		12^{15}	Lungenatmung sistiert. Reflexe schwächer
		5^{10}	Wieder Erschütterungsreflex
	23. II.	früh	Noch Rückenlage. Reflexe gesteigert
	24. II.	früh	Erholt
30. Ran. esculent., 24 g. Vorbehandelt wie in Versuch Nr. 20. 22. II. 08 10^{55} 0,012 g Veronal, gelöst in 2,0 ccm H_2O. Je 1 ccm Bauch- u. 1 Seitenlymphsack = 0,5 g V. pro 1 kg Frosch	22. II.	11^{25}	Erträgt Rückenlage. Starke Reflexsteigerung
		11^{40}	Nur noch für direkte taktile Reize empfängl. Lungenatmung sistiert. — 12^{15} Stat. idem
	23. II.	früh	Noch immer Rückenlage. Reflexe gesteigert, auch Erschütterungsreflex
	24. II.	10^{30}	Noch in Rückenlage. Doch vermag das Tier sich heute auf starke Reize in Bauchlage zu bringen. Ohne Reize jedoch Rückenlage weiter ertragen. Reflexe gesteigert
		12^{00}	Rückenlage spontan verlassen. Wird nicht mehr ertragen. Springt wieder auf Kneifen. Reflexe noch gesteigert
	25. II.	12^{00}	Völlig erholt

Über einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionen und Lecithineiweißmischungen.

Von

Hans Handovsky und Richard Wagner.

(Aus der physikalisch-chemischen Abteilung der biologischen Versuchsanstalt in Wien.)

(Eingegangen am 3. Januar 1911.)

Mit 3 Figuren im Text.

Angesichts der großen Bedeutung, die den lipoiden Substanzen in biologischer Hinsicht und besonders im Zellbestand als Angriffspunkten zahlreicher pharmakologisch wirksamer Substanzen zuzukommen scheint, galt es uns nicht als zwecklos, die Zustandsänderungen von Lecithinemulsionen mit jenen Mitteln der physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden anzugehen, die sich für die Untersuchung der Eiweißkörper an diesem Institut als überaus fruchtbar erwiesen haben, obwohl wir es da mit einem Material zu tun haben, das in seiner physikalisch-chemischen Homogenität hinter den Eiweißkörpern zurücksteht. Immerhin dürfte jede experimentelle Erweiterung des Tatsachenmateriales zur Erkennung und Beschreibung dieser wichtigen Körper willkommen sein.

Schon Porges und Neubauer[1]) haben in ihrer ersten Mitteilung über Lecithinemulsionen die fällende Wirkung von Säuren und Salzen auf die genannten Emulsionen eingehend studiert und dabei im wesentlichen die von Hofmeister und

[1]) Diese Zeitschr. 7, 152, 1907.

Pauli für das Eiweiß geltenden Ionenreihen auch für das Lecithin bestätigt gefunden. Wir versuchten nun auf Anregung von Herrn Professor Pauli, mittels der Bestimmung der Viscosität, deren Schwankung einen der feinsten Indicatoren im hydrophilen Verhalten von Emulsionskolloiden darstellt, die Zustandsänderungen des Lecithins näher kennen zu lernen.

Das Material, mit dem wir arbeiteten, war ein Gemisch von aus Eiern dargestellten Lecithinen, von Herrn Professor S. Fränkel uns in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt, das zu 95 bis 96°/₀ aus Trockensubstanz bestand; der Gesamtaschenrückstand, bezogen auf trockenes Lecithin, betrug 7,86°/₀, wovon 3,17°/₀ auf Phosphatidphosphorsäure entfielen, so daß nach Abzug derselben von der Gesamtasche 4,69°/₀ eigentlicher Aschengehalt übrig blieben.[1]) Zu allen unseren Versuchen verwendeten wir als Ausgangslösung eine 1,5°/₀ige wässerige Lecithinemulsion, die in der von Porges und Neubauer (l. c.) angegebenen Weise hergestellt wurde. 3 g Lecithin wurden gewogen, in möglichst wenig Äther vollkommen gelöst (vgl. unten) und dann mit 200 ccm Wasser ungefähr 1 Stunde kräftig geschüttelt. Darauf wurde etwa 48 Stunden CO_2-freie Luft im Dunkeln durchgeleitet, bis der ganze Äther vertrieben war. Die so hergestellten Emulsionen erwiesen sich für längere Zeit als vollkommen stabil, wie aus von Zeit zu Zeit zur Kontrolle ausgeführten Reibungsbestimmungen hervorging.

I.

Unsere ersten Versuche beziehen sich auf die innere Reibung von puren Lecithinemulsionen sowie von Laugen-, Säuren- und Salz-Lecithinen, worüber Tabelle I und II Aufschluß geben. In allen Versuchen erwies sich die Viscosität von Lecithinemulsionen als leicht bestimmbar und genau reproduzierbar.

Tabelle I.

Viscositätsbestimmungen an reinem, Laugen- und Salzlecithin. Versuchstemperatur war 37° C. Alle Reibungsbestimmungen in dieser Arbeit wurden mit dem Ostwaldschen Viscosimeter im Thermostaten bei konstanter Temperatur ausgeführt. Die angegebenen t-Werte sind die Durch-

[1]) Diese Analyse wurde im chem. Laboratorium der Spiegler-Stiftung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. S. Fränkel ausgeführt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle den verbindlichsten Dank sagen.

strömungszeiten in 0,2 Sek. $t_{H_2O} = 385$. Die ursprüngliche Lec.-Em. war 1,5%. Lec.-Em. A.

Lecithin-konzentration %	Konzentration von NaOH	Konzentration des Salzes	t	1000 t/t_0
0,2	—	—	418	1086
0,5	—	—	467	1213
0,8	—	—	517	1351
0,5	0,0067 n	—	425	1104
0,5	0,0201 n	—	421	1094
0,5	0,0335 n	—	420	1091
0,2	0,0067 n	—	401	1042
0,8	0,0007 n		451	1172
0,5	—	0,0067 n NaCl	436	1130
0,5	—	0,0067 n Na_2SO_4	436	1130

Tabelle II.

Viscositätsbestimmungen an Laugen-, Säuren- und Salz-Lecithinemulsionen. 1,5% Lecithinemulsion mit den betreffenden Zusätzen halbverdünnt (0,75%); $t_0 = 385 \frac{sec}{5}$, Versuchstemperatur 37°; Laugen- und Salzversuche mit Lec.-Em. B. Säure mit Lec.-Em. C. In der Tabelle sind die Elektrolytkonzentrationen nach der Mischung angegeben.

Lecithin + Lauge	t	t/t_0 ·1000	Lecithin + Salze	t	t/t_0 ·1000	Lecithin + Säure	t	t/t_0 ·1000
0,00 n-NaOH	446	1159	0,00 n-NaSCN	446	1159	0,00 n-CH_3COOH	493	1281
0,0001 n "	445	1156	0,001 n "	439	1140	0,01 n "	485	1260
0,001 n "	440	1143	0,01 n "	431	1120	0,02 n "	479	1244
0,01 n "	426	1107	0,01 n-NH_4SCN	431	1120	0,03 n "	487	1266
0,02 n "	425	1104				0,05 n "	492	1278
						0,01 n-HCl	462	1200

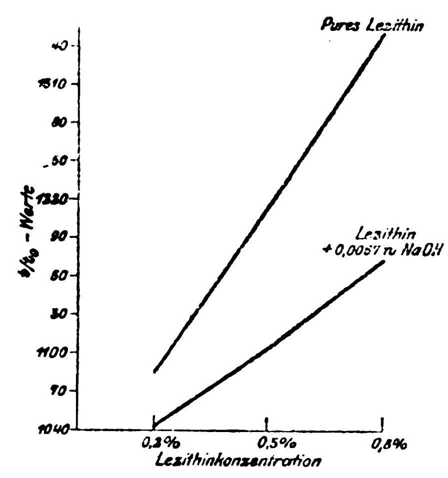


Fig. 1.

Aus den in Tabelle I registrierten Versuchen sehen wir vor allem, was auch Fig. 1 deutlich demonstriert, daß sich die Lecithinemulsionen in bezug auf ihre innere Reibung wie typische Emulsionskolloide verhalten; schon die Tatsache allein, daß die innere Reibung einer 0,75%igen reinen Lecithinemulsion eine beträchtliche Erhöhung gegenüber der von Wasser zeigt,[1])

[1]) Es ist bemerkenswert, daß sich die innere Reibung der wässerigen Lecithinemulsion

ferner vor allem, daß der Anstieg der Reibung mit steigender Lecithinkonzentration ein sehr steiler ist (Fig. 1), sprechen dafür, daß es sich bei unserem Lecithin um ein echtes Emulsionskolloid handelt, charakterisiert durch eine innige Beziehung zwischen Teilchen und Lösungsmittel. Aus diesen Versuchen (Tabelle I und II) geht aber außerdem auch hervor, daß alle Elektrolyte, Laugen, Säuren und Salze auf die innere Reibung des Lecithins im Sinne einer Viscositätsverminderung wirken.

Für die Einwirkung verschiedener Laugenkonzentrationen auf ein und dieselbe Lecithinkonzentration ergibt sich, daß die Erniedrigung der Lecithinreibung durch geringe Konzentrationen sowohl an Lauge als auch an Salz relativ am bedeutendsten ist und in höheren Konzentrationen des Elektrolyten nur in geringem Maße wächst. Die Kurve gewinnt dadurch eine auffallende Ähnlichkeit mit der bekannten Adsorptionsisotherme.

Bei Einwirkung ein und derselben Laugenkonzentration auf verschiedene Lecithinkonzentrationen ergeben sich interessante Verhältnisse. Wie aus Tabelle I hervorgeht, erniedrigt die 0,0067 n-NaOH die Viscosität des Lecithins in jeder untersuchten Konzentration um 50%. Es besteht in unserem Versuchsbereiche ein konstantes Verhältnis zwischen der inneren Reibung von reinem Lecithin und dem von mit Lauge versetzten Lecithin der gleichen Konzentration. So beträgt die Reibungserhöhung einer 0,2%igen Lecithinemulsion (gegenüber Wasser) 33, bei Zusatz der Lauge 16, bei einer 0,5%igen Emulsion sind die entsprechenden Werte 82 und 41, bei einer 0,8%igen 132 und 66.

Als Ursache dafür, daß die innere Reibung von Lecithinemulsionen sowohl durch Laugen, als auch durch Säuren und Salze erniedrigt wird, können wir vermuten, daß in der Emulsion in allen drei Fällen ein Entquellungsvorgang vor sich geht. In ihrer fällenden Wirkung hingegen zeigen Säuren, Laugen und Salze dem Lecithin gegenüber ein deutlich verschiedenes Verhalten.

Unsere Lecithinemulsionen erwiesen sich bei den Fällungsversuchen als etwas stabiler als die von Porges und Neubauer aus Handelslecithin hergestellten Emulsionen. Während Porges und Neubauer die Fällungsgrenze für NaCl schon bei $^{n}/_{2}$-Lösungen und für Ba-Salz bei 0,01 n-Lösungen fanden, trat an unseren Emulsionen die NaCl-Fällung selbst durch

---

um so niedriger einstellte, je weniger konzentriert die zur Herstellung der wässerigen Lecithinemulsionen verwendete ätherische Lecithinlösung war, je mehr Äther also zur Lösung derselben Lecithinmenge gebraucht worden war.

$^n/_1$-Lösungen noch nicht, die $Ba(NO_3)_2$-Fällung aber erst bei einer Konzentration von 0,05 n auf. Die erste Fällungszone, die Porges und Neubauer für die Salzsäure fanden, erwies sich bei genauerer Untersuchung als etwas breiter, und zwar reichte der fällende Konzentrationsbereich von 0,004 bis 0,01 n. **Salze hemmen in Konzentrationen, in denen sie selbst nicht fällen, die fällende Wirkung der (0,004 n-) Salzsäure.** Dafür sei als Beispiel Tabelle III angeführt.

Tabelle III.

1,5% Lecithinemulsion + 0,004 n-HCl + Salzlösung zu gleichen Teilen. „Versuchsresultate nach 24^h registriert.

Salzkonzentration	Resultat
0,00 n	±++
0,01 n-NaCl	—
0,02 n „	—
0,04 n „	—
0,001 n-$Ba(NO_3)_2$	—
0,002 n „	—
0,004 n „	—

Laugen hingegen bewirken keine Ausflockung des Lecithins, und Salzzusatz zum Laugenlecithin läßt die Emulsion unverändert. Über die fällende Wirkung von verschiedenen Salzen auf das reine Lecithin liegen bereits die notwendigen Versuche von Porges und Neubauer (l. c.) vor.

Die gute Verwendbarkeit der Reibungsmethode zur Erkenntnis feiner Veränderungen im Lecithin veranlaßte uns, auch einige narkotisch wirksame Substanzen in ihrem Einfluß auf die innere Reibung des Lecithins zu untersuchen. Eine orientierende Versuchsreihe mit den Stoffen Chloralhydrat, Bromalhydrat, Trional, Sulfonal und Äthylurethan zeigte, daß die Viscosität des reinen Lecithins nicht einsinnig und ganz unerheblich beeinflußt wird (vgl. die Tabellen IV und V). Nur der Alkohol macht eine Ausnahme, indem er die innere Reibung des Lecithins um ca. 2,5% erhöht;[1]) doch ist dieser Befund in Anbetracht des Umstandes, daß der Alkohol schon die Reibung von reinem Wasser ganz bedeutend erhöht, mit Reserve aufzunehmen, denn durch die Gegenwart des Lecithins wird das

[1]) Denn während z. B. ein 10%iger Alkohol eine um 28,7% höhere innere Reibung hat als Wasser, erhöht dieselbe Menge Alkohol eine 0,75%ige Lecithinemulsion um 31,2%.

zur Verfügung stehende Wasservolum verringert, der Alkohol mehr konzentriert und so die Reibung des Gemisches im Sinne einer weiteren Erhöhung verändert.

Tabelle IV.

1,5 %ige Lecithinemulsion D halbverdünnt; $t_0 = 362 \frac{sec.}{5}$, Versuchstemp. 37°.

Narkoticum	Normalität des Narkoticums	Wässerige Nark.-Lösung		Nark.-Lec.-Mischung	
		t	t/t_0	t	t/t_0
—	—	362	1000	448	1238
2,5 ccm n/100-Chloralhydrat	0,0025	358	988	451	1246
2,5 „ n/100-Bromalhydrat	0,0025	360	994	448	1238
2,5 „ n/100-Trional . . .	0,0025	358	988	447	1235

Tabelle V.

Lecithinemulsion E; $t_0 = 366 \frac{sec.}{5}$, sonst wie Tabelle IV.

Narkoticum	Normalität des Narkoticums	Wässerige Nark.-Lösung		Nark.-Lec.-Mischung	
		t	t/t_0	t	t/t_0
—	—	366	1000	435	1189
2,5 ccm gesättigter Sulfonal	ca. 0,0025 n	366	1000	435	1189
2,5 „ n/100-Äthylurethan	0,0025 n	368	1006	436	1192
1 „ absol. Alkohol . .	1,5 n	471	1287	571	1560

II.

Um physiologischen Verhältnissen näher zu kommen, da ja das Lecithin im Organismus nicht als wässerige Emulsion vorkommt, versuchten wir, die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Lecithin-Eiweiß-Mischungen näher zu untersuchen. Vorausschicken möchten wir, daß schon vor längerer Zeit auf Anregung von Herrn Professor Pauli zahlreiche derartige Versuche mit aus Rinder- und Pferdeserum extrahierten Lipoiden im Institute angestellt worden waren. — Sowohl natives als auch dialysiertes Rinder- und Pferdeserum wurde im Schacherlapparat durch mindestens 24 Stunden mit Äther extrahiert. Nachdem der Äther vertrieben war, wurden die Lipoide im Wasser aufgenommen. Mit solchen ca. 0,2%igen Emulsionen wurden mehrere Versuchsreihen ausgeführt. Kurz zusammengefaßt waren die Resultate derselben etwa folgende:

Rinder- und Pferdeserumlipoide ergaben nach 24 Stunden sowohl mit nativem als auch mit dialysiertem, lipoidhaltigem und lipoidfreiem Rinder- und Pferdeserum deutliche Fällungen, die sich mit zunehmender Lipoidkonzentration verstärkten. Ebenso waren die Lipoidemulsionen imstande, in dem Serum, aus dem sie extrahiert worden waren, eine Flockung hervorzurufen. Kontrollversuche mit Wasser ergaben keine Fällungen (nur das globulinreichere Pferdeserum zeigte eine zarte Flockung). Eine Lösung von 0,1 n-NaCl war imstande, diese Serumlipoid-Serumfällungen zu hemmen; 0,1 n-$Ca(NO_3)_2$ konnte sie nicht vollständig hemmen, wahrscheinlich infolge der starken fällenden Wirkung der Salze der alkalischen Erden auf Lipoide. Bemerkenswert ist noch ein Versuch, bei dem wir die Lipoide nicht im Wasser aufnahmen, sondern direkt in dem Serum, aus dem sie gewonnen worden waren (0,0495 g Lipoide + 20 ccm dialysiertes Rinderserum); auch in diesem Fall zeigte sich eine deutliche Ausflockung, die von NaCl mehr oder minder gehemmt werden konnte.

Ebenso wie die Serumlipoidemulsionen rufen auch unsere 1,5°/$_0$igen Lecithinemulsionen Fällungen unseres dialysierten Rinderserums hervor. Mehrere Gründe sprechen nun dafür, daß von Lecithin und ebenso von den Serumlipoiden im Rinderserum nicht das Albumin, sondern nur die Globuline gefällt werden. Zunächst ist die beobachtete Fällung nicht reichlich genug, als daß sie einer Gesamteiweißfällung entsprechen könnte, ferner macht es die hemmende Wirkung von Neutralsalzen auf die Fällung (für Lecithin s. u.) wahrscheinlich, daß es sich um Globuline handle, und endlich zeigt das in diesen Versuchen verwendete, extrem dialysierte Rinderserum noch immer bei Verdünnung mit Wasser zarteste Opalescenzen und nach längerem Stehen der Verdünnungen Änderungen in seiner elektrischen Leitfähigkeit. Um die Frage sicher zu entscheiden, welcher Eiweißkörper des Rinderserums an dieser Lecithinfällung beteiligt sei, machten wir den folgenden Versuch: Natives Rinderserum wurde mit Ammoniumsulfat halb gesättigt, nach 24stündigem Absitzen des Niederschlages wurde abfiltriert und das Filtrat bei Zimmertemperatur in einem geschlossenen Gefäß gegen destilliertes Wasser so lange dialysiert, bis im Außen-

wasser weder NH_4-Ion noch SO_4-Ion nachweisbar war. Die so gewonnene, wasserklare Albuminlösung versetzten wir mit Lecithin, wobei sich in keinem Falle eine Fällung ergab. Die folgenden Tabellen VI und VII illustrieren diesen Versuch.

Tabelle VI.

Je 5 ccm 1,5%ige Lecithinemulsion + Albuminlösung. Auf 10 ccm Gesamtvolum wurde mit destilliertem Wasser verdünnt.

Albuminlösung ccm	Resultat nach 48h
0	keine Fällung
1	„ „
2	„ „
3	„ „
4	„ „
5	„ „

Tabelle VII.

Je 5 ccm Albuminlösung + 1,5%ige Lecithinemulsion. Auf 10 ccm Gesamtvolum wurde mit destilliertem Wasser verdünnt.

Lecithinemulsion ccm	Resultat nach 48h
0	keine Fällung
1	„ „
2	„ „
3	„ „
4	„ „

Somit ist in hohem Grade wahrscheinlich gemacht, daß das Albumin an der Lecithin-Serumfällung nicht beteiligt ist, vielmehr die beobachtete Rinderserum-Lecithinfällung als eine Reaktion des Globulinrestes im Rinderserum aufzufassen ist.[1])

Über Einzelheiten in den Eigenschaften der Serum-Lecithinfällung und ihre Beeinflussung durch Elektrolyte orientieren die folgenden Versuche.

Diese wurden durchweg mit unseren 1,5%igen Lecithinemulsionen und dialysiertem elektrolytarmem Rinderserum angestellt. Das Rinderserum war 8 Wochen gegen fließendes, destilliertes Wasser, darunter 2 Wochen bei 30° dialysiert, vollständig klar, gerann bei 50° und hatte eine spezifische Leitfähigkeit von k = 0,000 030 52 (Stickstoffgehalt 0,3325%, Eiweißgehalt 2,0748%). Das Verhalten des Lecithins zum Rinderserum zeigte eine große Analogie zu dem der oben besprochenen Serumlipoide. Die im folgenden in den Lecithineiweißmischungen beobachteten Flockungen ließen deutlich zwei Typen erkennen. Die erste Form (K) wäre als Koagulation schlechthin zu bezeichnen mit Flocken am Boden des Gefäßes, die durch Schütteln nicht wieder in Lösung zu bringen waren. Die zweite (E) ist eine eigentümliche Form der Entmischung, bei der sich oben in einer Schicht über mehr oder weniger klarer Flüssigkeit

[1]) Diese Erfahrungen weisen auf einen Zusammenhang der zwei Phänomene am Luesserum hin, nämlich der Klausnerschen Beobachtung, daß destilliertes Wasser, in bestimmter Menge zu Luesserum zugesetzt, eine Globulinfällung erzeugt, und der bekannten Porgesschen Luesreaktion mit Lecithin und ähnlich wirkenden Substanzen.

Flocken ansammeln, die durch Schütteln wieder für einige Zeit in Verteilung gebracht werden können, aber bald wieder ausflocken. — Je gleiches Volum Emulsion und Rinderserum gibt eine deutliche Fällung vom Typus K; bei Lecithinüberschuß ist der Niederschlag stabiler als bei Serumüberschuß. Elektrolyte beeinflussen diese Fällung in ganz prägnanter Weise. Den Einfluß von Säuren kennzeichnet Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

(1,5%ige Lecithinemulsion A + Rinderserum) mit den entsprechenden Säuren zu gleichen Teilen gemischt. Die angeführten Konzentrationen der Säuren sind Endkonzentrationen nach der Mischung. ∅ bedeutet homogene Emulsion entsprechend der Ausgangslecithinemulsion. Beobachtung nach 24 Stunden.

a) 1,5 ccm Lec. + 3,5 ccm RS + 5 ccm Säure			b) 3,5 ccm Lec. + 1,5 ccm RS + 5 ccm Säure		
Säure	Konzentr.	Resultat	Säure	Konzentr.	Resultat
H_2O		+++K	H_2O		+++K
HCl	0,001 n	+++K	HCl	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	∅
	0,1 n	++E		0,1 n	++E
H_2SO_4	0,001 n	+++K	H_2SO_4	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	+++K
	0,1 n	++E		0,1 n	++E
$CCl_3.COOH$	0,001 n	+++K	$CCl_3.COOH$	0,001 n	+++K
	0,01 n	∅		0,01 n	+K
	0,1 n	+++K		0,1 n	++K
$CH_3.COOH$	0,001 n	++K	$CH_3.COOH$	0,001 n	+++K
	0,01 n	±		0,01 n	+K
	0,1 n	∅		0,1 n	++E

Die Säuren gehen also durch ein Lösungsmaximum; in 0,001 n Konzentrationen lassen sie den Niederschlag unverändert, in 0,01 n lösen sie ihn, in 0,1 n lassen sie ihn wieder im großen und ganzen unverändert; nur die schwache Essigsäure paßt sich nicht ganz diesem Schema an. Tabelle VIIIa illustriert diese Verhältnisse viel deutlicher als Tab. VIIIb, wo der stärkere Lecithingehalt das Lösungsmaximum verwischt. Laugen vermögen von einer bestimmten Alkalinität an den Lecithin-Rinderserumniederschlag wieder zu lösen; untersucht wurden Natronlauge, Ammoniak, Methylamin, Nikotin, Pyridin und Piperidin; 0,01 n-Piridin löst den Niederschlag noch nicht, die übrigen stärkeren Laugen in dieser Konzentration lösen bereits. Besonders bemerkenswert ist endlich der Einfluß der Salze auf den Lecithin-Rinderserumniederschlag (Tabelle IX). Im allgemeinen hemmen die Salze diese Fällung, und zwar ordnen sich die fällenden Ionen, der Ladung des Lecithins entsprechend vor allem die Kationen, zu einer bestimmten Reihenfolge: $NH_4 > Na >$

Ba = Mg. Die minder deutlich ausgesprochene Reihe der Anionen wäre: SCN > SO_4 > Cl.

Tabelle IX.

Alle Fällungen sind nach dem Typus E. Beobachtung nach 24 Stunden. (1,5%ige Lecithinemulsion + Rinderserum) mit den entsprechenden Salzen zu gleichen Teilen gemischt. Die angeführten Salzkonzentrationen sind Endkonzentration nach der Mischung. ∅ bedeutet homogene Emulsion entsprechend der Ausgangslecithinemulsion.

1,5 ccm Lec. + 3,5 ccm RS + 5 ccm Salz			3,5 ccm Lec. + 1,5 ccm RS + 5 ccm Salz		
Salz	Konzentr.	Resultat	Salz	Konzentr.	Resultat
H_2O		+++	H_2O		+++
NaCl {	0,05 n	++	NaCl {	0,05 n	+++
	0,5 n	+		0,5 n	+++
Na_2SO_4 {	0,05 n	+	Na_2SO_4 {	0,05 n	+++
	0,5 n	+		0,5 n	+++
NaSCN {	0,05 n	±	NaSCN {	0,05 n	+
	0,5 n	±		0,5 n	++
NH_4Cl {	0,05 n	∅	NH_4Cl {	0,05 n	∅
	0,5 n	∅		0,5 n	∅
NH_4.SCN {	0,05 n	±	NH_4.SCN {	0,05 n	∅
	0,5 n	±		0,5 n	+
$BaCl_2$	0,05 n	+++	$BaCl_2$	0,05 n	+++
$MgCl_2$	0,05 n	+++	$MgCl_2$	0,05 n	+++

Die folgenden Fällungsversuche dienten einer Orientierung über die Frage nach der Entstehung von Lecithin-Eiweißkomplexen. Die schon erwähnte Niederschlagsbildung von Lecithin mit salzarmem Rinderserum findet ihre einfachste Erklärung in der Annahme der Bildung von unlöslichen Lecithin-Globulinkomplexen, die durch Neutralsalzzusatz in Lösung gehalten werden können. Als diese Fällung hemmende Grenzkonzentration ergab sich (siehe Tab. X) für NH_4Cl 0,04 n, die, wie weitere Versuche zeigten (siehe Tab. XI), in weiten Grenzen von dem Verhältnis Lecithin-Rinderserum unabhängig ist.

Die übrigens quantitativ nicht leicht zu entscheidende Frage, ob es zur Bildung von Lecithin-Albuminkomplexen kommt, versuchten wir auf folgendem Wege zu beantworten. Es wurde zunächst die mit Sicherheit reines Lecithin in verschiedenen Verdünnungen fällende Bariumsalzkonzentration ermittelt.

Tabelle X.

1,5 ccm 1,5 %ige Lecithinemulsion + 3,5 ccm Rinderserum + 5 ccm NH_4Cl-Lösung. Fällungsresultat nach 24^h.

Salzkonzentration	Resultat
0,00 n	+++
0,01 n	+++
0,02 n	+++
0,03 n	+++
0,04 n	—
0,05 n	—
0,1 n	—
0,3 n	—
0,5 n	—

Tabelle XI.

1,5 %ige Lecithinemuls. + Rinderserum + 0,04 n-NH_4Cl. 10 ccm Gesamtvolum. Fällungsresultat nach 24^h.

Lecithin ccm	RS ccm	Resultat
0,5	4,5	—
1,0	4,0	—
1,5	3,5	—
2,0	3,0	—
2,5	2,5	—
3,0	2,0	—
3,5	1,5	—
4,0	1,0	—
4,5	0,5	—

Es zeigte sich, daß von 0,05 n an alle Konzentrationen von $Ba(NO_3)_2$ Lecithin quantitativ fällen. Diese Fällung wird durch anwesendes Eiweiß und Alkalisalz (siehe Tab. XII) nicht gehindert. In einer folgenden Versuchsreihe (siehe Tab. XIII) wurden nun Lecithin und Rinderserum in einem Verhältnisse, das von 1:9 bis 9:1 variierte, mit globulinlösendem Alkalisalz (0,04 n-NH_4Cl) und der sicher fällenden 0,1 n-$Ba(NO_3)_2$-Lösung versetzt. Überall trat flockige Fällung auf. Von den entstandenen Niederschlägen wurde abfiltriert, die Filtrate halbverdünnt und mit konzentrierter HNO_3 unterschichtet. In allen Proben entstanden positive Eiweißreaktionen, wobei die Ringe bloß entsprechend dem variierenden Eiweißgehalt an Mächtigkeit sich unterschieden.

Tabelle XII.

1,5 ccm 1,5 %ige Lecithinemulsion + 3,5 ccm Rinderserum + 5 ccm [0,04 n-NH_4Cl + $Ba(NO_3)_2$]. Fällungsresultat nach 24^h.

Konzentration von $Ba(NO_3)_2$	Resultat
0,00 n	—
0,01 n	—
0,02 n	—
0,03 n	—
0,04 n	—
0,05 n	+++
0,075 n	+++
0,1 n	+++

Tabelle XIII.

1,5 %ige Lecithinemulsion + Rinderserum + 0,04 n-NH_4Cl + 0,1 n-$Ba(NO_3)_2$. 10 ccm Gesamtvolum. Fällungsresultat nach 24^h.

Lecithin ccm	RS ccm	Resultat
0,5	4,5	+++
1,0	4,0	+++
1,5	3,5	+++
2,0	3,0	+++
2,5	2,5	+++
3,0	2,0	+++
3,5	1,5	+++
4,0	1,0	+++
4,5	0,5	+++

Ein Anzeichen für eine Bildung von Lecithin-Albuminkomplexen selbst bei bedeutendem Überschuß des Lecithins (9:1) konnte nicht gefunden werden. Die von André Mayer[1]) beobachteten Lecithin-Eiweißkomplexe widersprechen unseren Beobachtungen nicht, da sie sich nur auf das Zusammenbringen von elektropositivem Albumin mit Lecithin beziehen. Wir müssen übrigens ausdrücklich hervorheben, daß unsere Versuche nicht gegen eine geringgradige Bindung von neutralem Albumin an das Lecithin sprechen, sondern nur gegen die Reaktion einer erheblicheren Eiweißmenge mit dem Lecithin unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen.

Endlich sei noch erwähnt, daß Salze imstande sind, den Niederschlag einer Säure-Lecithin-Rinderserummischung zu lösen, ebenso wie sie den Niederschlag aufhellen, den Säuren im reinen Lecithin hervorrufen:

Wir versetzten eine Mischung aus 2,5 ccm einer 1,5°/$_0$igen Lecithinemulsion und 2,5 ccm einer ca. 2°/$_0$igen RS-Lösung mit 5 ccm $^n/_{10}$-HCl, so daß die ganze Mischung einer 0,05 n-HCl entsprach; dabei wurde die Flüssigkeit unhomogen, aber der entstandene Niederschlag löste sich wieder, wenn wir 0,04 n-Na_2SO_4, NH_4SCN oder $Ba(NO_3)_2$ zufügten.

Schließlich seien noch Beispiele aus einer Anzahl von Versuchen erwähnt, die sich mit der Viscosität von Laugen-Lecithin-Rinderserummischung befassen mit entsprechender Variation aller drei Komponenten. Die graphischen Darstellungen in Fig. 1, 2 und 3 bieten einen guten Überblick über diese Versuche.

Kurz zusammengefaßt lautet das Ergebnis dieser Viscositätsbestimmungen folgendermaßen: mit steigendem Lecithingehalt wächst die innere Reibung von Laugeneiweiß; ebenso wächst die Viscosität von Laugenlecithin mit steigendem Eiweißgehalt und desgleichen die von Lecithineiweiß mit steigender Laugenkonzentration. Im ganzen und großen verrät, konform den obigen Fällungsversuchen (Tab. XIII), das Verhalten von Lecithineiweißmischungen keine Besonderheiten, die auf die Bildung von neuen Komplexen aus beiden Komponenten

---

[1]) André Mayer und E. F. Terroine, Untersuchungen über die kolloiden Komplexe der Albuminoide und Lipoide. I. Die Lecithalbumine sind kolloide Komplexe. Compt. rend. Soc. Biol. 62, 398, 1907

Tabelle XIV.

Lecithinemulsion A: $t_0 = 385$. Versuchstemperatur: 37° C.

	Konz. des Lecithins %	Konz. des Rinderserums %	Normalität der NaOH	t	t/t_0
A					
	—	0,27	—	391	1016
	—	0,66	—	401	1042
	—	1,07	—	411	1068
B					
	—	0,27	0,0067 n	400	1039
	—	0,66	0,0067	411	1068
	—	1,07	0,0067	422	1096
C					
	0,2	—	—	421	1093
	0,5	—	—	467	1213
	0,8	—	—	520	1351
D					
	0,2	—	0,0067	401	1042
	0,5	—	0,0067	423	1099
	0,8	—	0,0067	451	1171
E					
	—	0,66	0,0067	411	1068
	0,2	0,66	0,0067	423	1098
	0,5	0,66	0,0067	446	1159
	0,8	0,66	0,0067	472	1226

	Konz. des Lecithins %	Konz. des Rinderserums %	Normalität der NaOH	t	t/t_0
F					
	—	0,27	0,0067	400	1039
	0,5	0,27	0,0067	439	1124
G					
	—	1,07	0,0067	422	1096
	0,5	1,07	0,0067	462	1200
H					
	0,5	—	0,0067	423	1099
	0,5	0,27	0,0067	434	1124
	0,5	0,66	0,0067	446	1159
	0,5	1,07	0,0067	462	1200
I					
	0,2	—	0,0067	401	1042
	0,2	0,66	0,0067	423	1098
K					
	0,8	—	0,0067	451	1171
	0,8	0,66	0,0067	485	1260
L					
	0,2	0,66	0,0067	423	1098
	0,2	0,66	0,0201	462	1200
M					
	0,5	0,27	0,0067	434	1124
	0,5	0,27	0,0201	454	1179

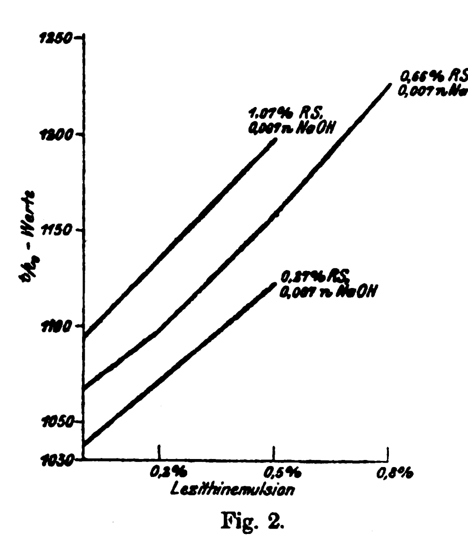


Fig. 2.

mit besonderen Eigenschaften schließen ließen, sondern beide, Lecithin und Eiweiß, wahren mehr oder weniger ihre Eigenschaften in der Mischung. Dafür dürften wir als Beleg vielleicht auch Berechnungen aus unseren Reibungsversuchen anführen, nach denen die aus der Summe des NaOH-Lecithins und Rinderserum berech-

neten Werte immer kleiner waren als die beobachteten, so daß wir annehmen können, daß die immer im Überschuß vorhandene NaOH sowohl vom Lecithin als auch vom Rinderserum gebunden wird.

In biochemischer Hinsicht scheint uns von Interesse, daß die Ionen der Elektrolyte mit ihrer Funktion, das Globulin im Solzustande zu erhalten (Pauli[1]), zugleich die Rolle verbinden, die Entstehung eines unlöslichen Lecithin-Globulinkomplexes in den tierischen Säften und wohl auch Geweben hintanzuhalten.

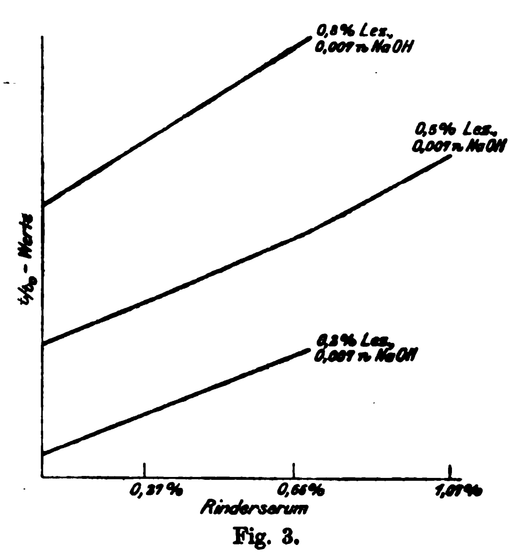


Fig. 3.

Schlußsätze.

1. Lecithinemulsionen zeigen eine bedeutende Reibungserhöhung gegen Wasser; diese wird durch Zusatz von Elektrolyten, sowohl Säuren, Basen als auch Salzen wieder herabgesetzt.

2. Die durch Salzsäure hervorgerufene Lecithinfällung kann durch Salze in Konzentrationen, die selbst nicht fällen, gehemmt werden.

3. Indifferente Narkotica lassen die Reibung von Lecithinemulsionen nahezu unverändert.

4. Das in einem sehr elektrolytarmen Serum eben noch in Lösung gehaltene Globulin wird durch Lecithin gefällt. Diese Fällung wird durch Neutralsalze gehemmt.

5. Dagegen lassen weder Fällungs- noch Viscositätsuntersuchungen eine Bildung von Kolloid-Komplexen aus Lecithin und neutralem Serumalbumin erkennen, wenn das Lecithin in Form einer Emulsion in Reaktion tritt.

---

[1]) Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweißkörper. Pflügers Archiv 78, 315, 1899.

Über die chemische und biologische Differenzierung der drei Eiweißkörper in der Kuh- und Frauenmilch.

Von

J. Bauer und St. Engel.

(Aus der Akademischen Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 9. Januar 1911.)

Die totale Trennung der 3 Milcheiweißkörper: Casein, Albumin, Globulin ist bisher chemisch nur selten und biologisch noch niemals durchgeführt worden.

Seit Sebelien[1]) im Jahre 1885 mit Sicherheit festgestellt hat, daß neben dem Casein noch 2 Eiweißkörper, ein Albumin und ein Globulin in der Molke vorhanden sind, hat man wohl von dieser Tatsache allgemein Notiz genommen, sich aber sonst nur wenig mit diesen Körpern beschäftigt. Man hat vielmehr meist nur das Casein für sich und hiervon getrennt den Gesamtkomplex der Molkeneiweißkörper betrachtet.

Die neueren Handbücher der Biochemie (Oppenheimer) und der biochemischen Arbeitsmethoden (Abderhalden) legen hiervon Zeugnis ab. In wenigen Zeilen kann das Bekannte über das Lactalbumin und Lactoglobulin abgehandelt werden. Bei der Frauenmilch spez. ist überhaupt vom Albumin und Globulin noch nichts bekannt, nicht einmal ihr gegenseitiges Mengenverhältnis. Über diesen Punkt geben bei der Kuhmilch wenigstens einige Untersucher Daten an. Sie lehren, wie schon Sebelien erkannte, daß das Albumin reichlicher vorhanden ist als das Globulin. Vom Albumin ist weiter noch die elementare Zusammensetzung und die Krystallisierbarkeit geprüft worden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen[2]) wurden wir von mehreren Gesichtspunkten geleitet. Zunächst war uns daran gelegen, die chemischen Methoden der Trennung von

---

[1]) Sebelien, Beitr. z. Kenntn. d. Eiweißk. d. Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 445, 1885.

[2]) Ein Teil der Versuche wurde unter der Leitung der Verfasser von den Herren Philipp und Eufinger angestellt. Die bezügl. Dissertationen erscheinen demnächst.

Casein und Molke durch den biologischen Versuch auf ihre Vollständigkeit und Brauchbarkeit zu prüfen, und weiterhin wollten wir uns über die Verwandtschaft der einzelnen Eiweißkörper untereinander und mit denen des Blutes klar werden. Als notwendiges und natürliches Bindeglied haben wir unter diesem Gesichtspunkt auch das Colostrum und seine Proteine in den Kreis der Betrachtungen gezogen.

Chemische Trennung. Herstellung der Eiweißkörper.

Unsere erste Aufgabe mußte sein, die verschiedenen Eiweißkörper isoliert voneinander zu gewinnen. Wir bedienten uns hierbei folgender Methodik: Das Casein wurde, wie es Engel[1]) für die Frauenmilch und auf seine Veranlassung Friedheim[2]) für andere Milcharten ausgearbeitet hat, so abgetrennt, daß zur Milch in 5facher Verdünnung jene Menge $^{n}/_{10}$-Essigsäure zugefügt wurde, die eine komplette Fällung erzielt (ca. 60 bis 80 ccm auf 100 ccm Kuhmilch). Auf diese Weise erhielt man Casein und Molke. Das Casein wurde in der üblichen Weise weiter verarbeitet und als Pulver aufbewahrt. Die Molken wurden zur Gewinnung von Albumin und Globulin benutzt. Um hierbei nicht mit allzu großen Flüssigkeitsmengen operieren zu müssen (der Eiweißgehalt unverdünnter Molken beträgt bei Kuhmilch wie bei Frauenmilch je nur knapp 0,5 $^{0}/_{0}$), haben wir uns öfters mit Vorteil solcher Milch bedient, die längere Zeit in gefrorenem Zustande aufbewahrt worden war. Nach dem Auftauen fällt ein Teil des Caseins spontan aus, der Rest läßt sich leichter, d. h. auch bei geringer Verdünnung mit Hilfe von Essigsäure abscheiden.

Das Verfahren gestaltete sich so, daß die gröbsten Caseinmengen zunächst durch ein Coliertuch zurückgehalten wurden. Es restierte eine grünlich-gelbliche trübe Flüssigkeit. Sie wurde mit dem halben Volumen $^{n}/_{10}$-Essigsäure versetzt und bis zum doppelten Volumen mit Wasser ergänzt. Das Casein schied sich in groben Flocken aus. Durch ein Faltenfilter erhielt man sofort ein klares, stark lichtbrechendes, grünliches Filtrat.

---

[1]) Engel, Eine einf. Meth. zur quant. Abscheidg. usw. Diese Zeitschr. 14, 234, 1908.

[2]) Friedheim, Über die Stickstoffvert. i. d. Kuh-, Büffel-, Ziegen-, Frauen- u. Eselsmilch usw. Diese Zeitschr. 19, 132, 1909.

Hieraus wurde nach vorangegangener Neutralisierung bis zur amphoteren Reaktion (gegen Lackmus) das Globulin mit $MgSO_4$ in Totalsättigung oder $(NH_4)_2SO_4$ in Halbsättigung ausgeschieden. Das nunmehr sich ergebende Filtrat war nicht mehr gefärbt, wohingegen das auf dem Filter sich sammelnde Gerinnsel öfters deutlich bräunlich tingiert war. Wir machen hierauf ausdrücklich aufmerksam, weil aus dieser Erfahrung hervorzugehen scheint, daß die Färbung des Milchserums durch das darin enthaltene Globulin bedingt ist.

Aus dem salzhaltigen Filtrat wurde das Albumin nach dem Vorgang von Sebelien durch Essigsäure gefällt. Es erwies sich hierbei — Vorversuche mit abgestuften Mengen — als zweckmäßig, für 100 ccm Filtrat 5 ccm 20%ige Essigsäure zu nehmen.

Die Globulinniederschläge wurden 3 mal umgefällt und teils dialysiert, teils, um das Ausfallen zu verhüten, in der letzten salzhaltigen Lösung benutzt. Das Albumin wurde weder der Umfällung noch Dialyse unterworfen.

Die geschilderte Darstellung der Proteine bezieht sich zunächst auf die Kuhmilch, doch wurde mutatis mutandis das gleiche Verfahren im Prinzip auch beim Colostrum und bei der Frauenmilch angewendet.

Albumin und Globulin wurden in Lösung aufbewahrt (eingefroren). Der Stickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl festgestellt.

Das Ausgangsmaterial bei Kuh- und Frauenmilch war Mischmilch, teils frische, teils längere Zeit im gefrorenen Zustande aufbewahrte Milch. Das benützte Colostrum war 1 Stunde nach dem Kalben von einer 6 jährigen Kuh ermolken, war hellgelb, enthielt 5,25% Fett und 21,76% Eiweiß.

Sind wir nun berechtigt, die so gewonnenen Proteine als einheitliche Körper zu betrachten und sind wir auch berechtigt auszuschließen, daß etwa der eine Eiweißkörper durch den andern verunreinigt sei? Frühere Untersuchungen[1]) haben uns gelehrt, daß die Essigsäure offenbar nur schwer mit dem Casein Acidcasein bildet, ein Umstand, der daraus hervorgeht, daß die Caseinniederschläge auch dann nicht in Auflösung

---

[1]) Engel, Vergleichende Unters. ü. d. Verhalt. der Frauenmilch z. Säure u. Lab. Diese Zeitschr. 18, 89, 1908.

gehen, wenn man bei der Fällung die Säure überdosiert. Wir dürfen also annehmen, daß die klarfiltrierten Molken wirklich caseinfrei waren.

Diese Feststellung ist deswegen so wichtig, weil der aus der Molke durch Halbsättigung mit Ammonsulfat ausgeschiedene Körper sich ja besonders leicht mit Casein verunreinigen ließe, weil auch dieses durch die gleiche Konzentration gefällt wird. Aber selbst wenn in die erste Molkenfraktion noch Casein hineingekommen sein sollte, so wird es durch die wiederholte Umfällung eliminiert. Für die Zugehörigkeit des gewonnenen Körpers zu den Globulinen sprechen eine Anzahl von Eigenschaften, die ihm innewohnten:

1. Die Löslichkeit in 5 bis 10%igen Salzlösungen.
2. Die Fähigkeit der Hitzekoagulation.
3. Die Abscheidung eines schwerer löslichen Anteiles beim Dialysieren.
4. Der Umstand, daß der Körper seine Löslichkeit sehr leicht verlor.

Es ist somit der Schluß gestattet, daß der durch Halbsättigung aus der Molke gewonnene Körper den Charakter eines Globulins hatte.

Der durch Ganzsättigung gewonnene Molkeneiweißkörper charakterisierte sich als Albumin schon durch seine schwere Fällbarkeit und seine leichte Löslichkeit in Wasser.

Es muß also entgegen immer wieder auftauchenden Meinungen daran festgehalten werden, daß in der Milch tatsächlich Albumin und Globulin enthalten ist.

Biologische Trennung.

Lassen sich die Eiweißkörper der Milch, die wir chemisch isoliert haben, auch biologisch differenzieren? Mit anderen Worten: entsprechen den chemischen Individuen auch biologische?

Wenn wir uns diese Frage vorlegen, so müssen wir a priori daran zweifeln, wenn wir bedenken, daß wir ja sonst den Eiweißantigenen Arteigenheit vindizieren, d. h. also Unterschiede nur zwischen den Proteinen verschiedener Arten anerkennen. Die einzelnen Eiweißkörper der Milch gehören aber alle derselben Art an. Schon Bordet aber hatte der Milch durch seine glänzende Entdeckung eine Sonderstellung angewiesen, und Hamburger[1]), der als erster die Frage der Differenzierung der einzelnen Milcheiweißkörper anschnitt, hatte schon geglaubt, das Casein vom Albumin der Kuhmilch differenziert zu haben. Allerdings waren seine Resultate nicht eindeutig

[1]) Hamburger, Biologisches über die Eiweißkörper der Kuhmilch usw. Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 49.

ausgefallen. Deshalb hat J. Bauer[1]) dieses Problem aufgenommen: Auch er fand, daß sich das Casein von den Eiweißkörpern der Molke biologisch trennen läßt.

Wie läßt sich diese Tatsache mit der Annahme der Arteigenheit vereinen?

Wir wissen, daß alle Arteigenheit nur eine relative ist. Das geht schon daraus hervor, daß das Antiserum gegen irgend ein Säugetiereiweiß bci gewisser Konzentration mit allen Säugetiereiweißen noch eine Reaktion gibt (mamalian reaction). Deshalb wird bekanntlich bei der Ausübung der forensischen Blutprobe nach Uhlenhuth-Wassermann verlangt, daß die betreffende zu untersuchende Blutflüssigkeit eine ungefähr bekannte Eiweißkonzentration von nicht unter 1:1000 besitzt.

Wir können demgemäß nicht erwarten, daß verschiedene Eiweißkörper derselben Tierart sich biologisch absolut trennen lassen. Das Problem liegt vielmehr so: lassen die einzelnen Eiweißkörper desselben Tieres oder noch spezieller desselben Gewebes trotz ihrer Artverwandtschaft noch Differenzen erkennen? Das ist in der Tat der Fall, wie für den speziellen Fall der Milch von Bauer gezeigt worden ist. Bauer[2]) und noch detallierter sein Mitarbeiter Kollmeyer[3]) konnten den Nachweis erbringen, daß sich die Caseine verschiedener Tierarten weitgehend sowohl von den Eiweißstoffen der Molke wie von denen des Blutserums derselben Art abtrennen lassen. Die Schärfe der Differenz ist sogar eine so große, daß bei nahe verwandten Tierklassen die Caseine der verschiedenen Arten (Ziege, Kuh, Büffel) sich weniger unterscheiden als das Casein und die Molken- bzw. Serumeiweißstoffe derselben Art. Die besondere biologische Stellung des Caseins, die aus den angeführten Tatsachen erhellt und die übrigens ein Analogon auch in gewissen biochemischen Besonderheiten dieses Körpers findet, ist so ausgesprochen, daß die Differenzierung von Milch und Serum selbst bei den Milcharten gelingt, die, wie z. B. die

[1]) J. Bauer, Zur Biologie der Milch. Verh. der Gesellsch. f. Kinderheilk., Salzburg 1909.

[2]) Bauer, Über den Artcharakter der Milcheiweißkörper. Berl. klin. Wochenschr. 1910, Nr. 18.

[3]) Kollmeyer, Über die biologische Differenzierung von Milch und Milcheiweißkörpern. Zeitschr. f. Biol. 54.

Frauenmilch neben dem Casein, auch prozentual genommen, beträchtliche Mengen an Albumin und Globulin enthalten. So sagt Bauer (l. c.): „Eine solche Trennung gelingt bis zu gewissem Grade zwischen Milch und Blutserum eines Tieres zu erzielen. Wenn auch diese Differenzierung nicht immer vollständig zu erreichen ist, namentlich nicht bei den sogenannten Albuminmilchen, so ist sie doch quantitativ deutlich ausgesprochen und praktisch darstellbar." Damit findet ein Zweifel von Bauereisen[1]) seine Erledigung. Dieser Autor, dem wir eine eingehende Studie über die biologische Differenzierung der Milch- und Serumeiweißkörper des Menschen verdanken, hat mit Hilfe der Präcipitation ähnliche Befunde wie Bauer erhoben. Gleichwohl wundert er sich, daß Bauer die Trennung von Frauenmilch und Menschenserum gelungen ist. Er vermutet, daß dieser Trennung der hohe Gehalt an Molkenproteinen entgegenstehen müßte. Bauereisen berücksichtigt eben nicht die oben angeführte Sonderstellung des Caseins.

Ist es nun beim Casein — vermöge seiner biologischen Eigenstellung — methodisch relativ einfach, seine Abtrennung von anderen Eiweißkörpern derselben Art zu vollziehen, so müssen bei minder großen Dissonanzen die Versuchsbedingungen eben so gewählt werden, daß kleinere Differenzen auch zum Vorschein kommen können. Es empfiehlt sich daher hier von der Präcipitation Abstand zu nehmen und lieber die spezifischere Komplementbindung heranzuziehen, eine Methode, die natürlich auch beim Arbeiten mit Casein ihre großen Vorzüge hat. Selbstverständlich ist eine weitere Voraussetzung des Erfolges, daß man mit hochwertigen Antiseren arbeitet.

Unter Beobachtung der angeführten Kautelen haben wir die Beziehungen zwischen Casein, Albumin und Globulin bei der Milch und beim Colostrum und auch wechselseitig zwischen Milch- und Colostraleiweißkörpern geprüft.

Kuhmilch.

Die Tatsache, daß sich das Casein von dem Gesamtkomplex der Molkeneiweißkörper differenzieren läßt, steht, wie oben

[1]) Bauereisen, Die Beziehungen zwischen dem Eiweiß der Frauenmilch und dem Serumeiweiß von Mutter und Kind. Habilit.-Schrift, Marburg, 1910. Arch. f. Gynäk. 90.

gesagt, fest. Wie verhält sich nun das Casein zum Albumin und Globulin einzeln. Hierin, wie überhaupt in all die zu prüfenden Verhältnisse genauen Einblick zu gewinnen, war natürlich nur möglich, wenn man immer genau gleiche Mengen untereinander verglich. Die Konzentration der Eiweißlösungen wurde daher durch N-Bestimmung nach Kjeldahl festgestellt. Durch Verdünnung wurden dann sämtliche in einem Versuch verwendeten Flüssigkeiten auf die gleiche Stärke gebracht.

I. Verhältnis von Casein zu Albumin und Globulin. Ein Caseinantiserum reagiert naturgemäß bis zu einer hochgradigen Verdünnung mit Casein selber. Das entspricht früheren Feststellungen. Mit den Molkeneiweißkörpern hingegen erfolgt zwar auch eine Reaktion, jedoch erst bei ganz unverhältnismäßig stärkeren Konzentrationen. Dabei ergibt sich aber weiter ein bemerkenswerter Unterschied zwischen dem Albumin und Globulin. Das letztere zeigt nämlich noch in stärkerer Verdünnung mit dem Caseinantiserum Komplementbindung wie das Albumin. Rangiert man also die Milcheiweißkörper nach ihrer Verwandtschaft miteinander, so kommt erst das Casein, weit von ihm entfernt das Globulin und zuletzt, nicht wesentlich weiter ab, das Albumin. Näheres hierüber noch bei der Frauenmilch, s. S. 62.

Tabelle I.
Hämolyse
bei Einwirkung von 0,1 ccm Kuhmilch-Casein-Antiserum (50) auf 0,5%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen (je 1 ccm)	Kuhmilch-Casein	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Molke
$^1/_4$	0	0	0	0
$^1/_8$	0	0	0	0
$^1/_{16}$	0	0	fast 0	0
$^1/_{32}$	0	fast 0	mäßig	0
$^1/_{64}$	0	Spur	stark	Spur
$^1/_{128}$	0	wenig	komplett	mäßig
$^1/_{256}$	0	mäßig	"	fast komplett
$^1/_{512}$	mäßig	stark	"	komplett
$^1/_{1024}$	fast komplett	komplett	"	"
$^1/_{2048}$	komplett	"	"	"
0	"	"	"	"

II. Verhältnis von Albumin zu Globulin und umgekehrt. Hier war die Frage besonders interessant, ob sich

eine Differenzierung würde erzielen lassen. Ist es doch mit den bisherigen biologischen Methoden noch nicht sicher gelungen, Albumin und Globulin derselben Herkunft einwandfrei zu trennen, so daß die Meinungen über diese Möglichkeit durchaus noch nicht geklärt sind. Wir verweisen nur auf die diesbezüglichen Ausführungen von Uhlenhut und Weidanz in ihrem bekannten Buche.[1]) Die Ausschläge in unseren Versuchen, wo das Problem zum ersten Male mit Hilfe der Komplementbindungsmethode angegangen wurde, waren eindeutig. Die Antisera des Globulins reagierten in weit stärkeren Verdünnungen mit Globulin als mit Albumin und umgekehrt. Je nach der Wertigkeit der Antisera erhielten wir Unterschiede, die vom 10 bis 1000fachen schwanken.

Tabelle II.
Hämolyse
bei Einwirkung von Kuh-Colostrum-Albumin-Antiserum (93) 0,05 ccm auf 0,5%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Casein
1	0	0	wenig
1/2	0	0	mäßig
1/4	0	0	stark
1/8	0	0	fast komplett
1/16	0	mäßig	komplett
1/32	0	"	"
1/64	0	stark	"
1/128	mäßig	"	"
1/256	stark	komplett	"
1/512	komplett	"	"
1/1024	"	"	"

Für die Milch ist also hiermit bewiesen, daß alle drei konstituierenden Eiweißkörper sich biologisch deutlich differenzieren lassen. Anzunehmen ist, daß die von uns herangezogene Methodik auch auf die Proteine anderer Gewebselemente und Gewebsflüssigkeiten mit Erfolg anwendbar ist. Damit sind neue Differenzierungsmöglichkeiten für die Biologie gegeben, über deren wissenschaftliche und praktische Konsequenzen man erst später wird ein Urteil abgeben können. Jedoch sei hier wenigstens darauf hingewiesen, daß mit der Erkenntnis von der biologischen Trennbarkeit an sich art-

[1]) Uhlenhut und Weidanz, Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens. Jena 1909.

gleicher Eiweißkörper die Möglichkeit in den Gesichtskreis tritt, daß ev. in einem Organismus durch von ihm selbst stammende Proteine Wirkungen ausgelöst werden könnten, wie sie ähnlich sonst nur durch artfremde Eiweißkörper erzeugt werden.

Tabelle III.
Hämolyse
bei Einwirkung von 0,05 ccm Kuhmilch-Globulin-Antiserum (162) auf 0,6%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1/2	0	0	0
1/4	0	0	fast 0
1/8	0	0	wenig
1/16	0	0	stark
1/32	0	0	fast komplett
1/64	0	mäßig	" "
1/128	0	stark	" "
1/256	0	"	komplett
1/512	0	"	"
1/1024	0	fast komplett	"
1/2048	0	komplett	"
1/4096	0	"	"
1/8192	0	"	"
1/16384	0	"	"
1/32768	mäßig	"	"
1/65536	komplett	"	"
0	"	"	"

Tabelle IV.
Hämolyse
bei Einwirkung von Kuh-Colostrum-Globulin-Antiserum (92) 0,03 ccm auf 0,04%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuh-Colostrum-Albumin	Kuh-Colostrum-Casein
1	0	0	0
1/2	0	0	Spur
1/4	0	0	mäßig
1/8	0	0	stark
1/16	0	wenig	komplett
1/32	0	stark	"
1/64	0	fast komplett	"
1/128	mäßig	komplett	"
1/256	stark	"	"
1/512	fast komplett	"	"
0	komplett	"	"

III. Verhältnis von Albumin und Globulin zu Casein. Die Antisera des Lactalbumins und des Lactoglobulins reagierten wechselseitig mit den zugehörigen Antigenen besser als mit dem Casein. Trotz der eben nachgewiesenen Trennbarkeit der beiden Molkenproteine erwies sich ihre Verwandtschaft untereinander doch größer als die mit dem Casein. Scheinbar paradoxerweise verhielten sich die Antisera des Albumins und Globulins in dieser Hinsicht ziemlich gleich, wiewohl man doch hätte vermuten sollen, daß das Globulinantiserum besser mit dem Casein reagieren würde wie das Albuminantiserum. (Hierzu s. Tab. II bis IV.)

IV. Schließlich wurde noch geprüft, wie die drei Milcheiweißkörper mit der Molke als Ganzes in Reaktion treten. Wie zu erwarten stand, verhielt sich das Casein relativ refraktär, während Albumin und Globulin noch in stärkeren Verdünnungen Komplementbindung gaben.

Auffällig war dabei, daß Molkenantiserum mit Globulin etwas weiter als mit Albumin reagierte, wiewohl man doch nach Maßgabe des quantitativen Vorkommens das Gegenteil hätte vermuten sollen.

Tabelle V.

Hämolyse

bei Einwirkung von 0,1 ccm Kuhmilch-Molken-Antiserum (161) auf 0,32%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Molke	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1	—	—	—	0
1/2	—	—	0	0
1/4	0	0	0	0
1/8	0	0	0	wenig
1/16	0	0	0	mäßig
1/32	0	0	0	stark
1/64	0	0	0	fast komplett
1/128	0	0	fast 0	komplett
1/256	0	0	„ 0	„
1/512	0	0	mäßig	„
1/1024	wenig	mäßig	stark	„
1/2048	stark	komplett	komplett	„
1/4096	komplett	„	„	„
0	„	„	„	„

Nimmt man hierzu noch, daß man durch die Injektion sehr schwacher Globulinlösungen dennoch sehr wirksame Anti-

sera erzeugen konnte, so gewinnt man den Eindruck, daß das Globulin ein besserer Antikörperbildner ist als das Albumin. Es stützt das die Annahme, daß auch das Serumglobulin der biologisch wirksamere Anteil des Serums ist. (L. Michaelis.)

Kommen wir nun zu einer der anfänglich aufgeworfenen Fragen, nämlich, ob die biologischen Methoden zur Kontrolle der chemischen Trennungsverfahren benutzt werden können, insbesondere zur Prüfung der Caseinfällung in der Milch, so ergibt sich, daß das wohl nur in beschränktem Umfange möglich ist. Caseinantiserum reagiert ja auch mit den reinen Molkenproteinen. Demgemäß wird es im gegebenen Falle ohne genaueste quantitative Auswertung bei der Prüfung einer Molke auf ihre Caseinfreiheit kaum möglich sein zu entscheiden, ob die Komplementablenkung nur auf die Molkenproteine oder auch noch auf Spuren von Casein zu beziehen ist, denn nur um Spuren kann es sich ja handeln.

Colostrum.

Für die Eiweißkörper des Colostrums gilt genau das gleiche wie für die der reifen Milch. Wir beschränken uns daher auf die Wiedergabe der entsprechenden Tabellen (s. o.).

Colostrum und Milch.

Für die Genese der Molkeneiweißkörper war es von der größten Wichtigkeit, sie mit denen des Colostrums zu vergleichen.

Die Colostrumeiweißkörper wurden auf folgende Weise dargestellt. Das Sekret wurde 5fach verdünnt und zu 300 ccm der Verdünnung 250 ccm Wasser und 50 ccm $^{n}/_{10}$-Essigsäure zugefügt. Das Casein wurde abfiltriert und in der üblichen Weise weiter präpariert. Das Filtrat vom Casein war klar.

Aus der Molke wurde das Globulin durch Halbsättigung mit $AmSO_4$ abgeschieden. Der Niederschlag wurde in schnell laufender Zentrifuge abfiltriert. Nachdem die überstehende Flüssigkeit abgegossen war, wurde sofort mit Wasser zur Hälfte aufgefüllt. Das Sediment löste sich alsbald. Nun wurde mit $AmSO_4$ (gesättigte Lösung) das Zentrifugenglas gefällt und der entstehende Niederschlag wieder abzentrifugiert. Dieser Prozeß wurde noch 2mal wiederholt. Die letzte Lösung wurde benutzt.

Das Albumin wurde wieder aus einem Filtrate von mit $AmSO_4$ halbgesättigter Molke durch Essigsäure abgeschieden. (Siehe S. 48.)

Von dem Casein[1]) wird angenommen, daß es mit dem der Milch identisch sei, während vom Globulin Tiemann[2]) glaubte feststellen zu können, daß es von dem der Milch differiere. Allerdings sind diese Angaben niemals nachgeprüft worden. Unsere biologischen Versuche vermochten den ersten Befund zu erhärten, traten aber in Widerspruch zu dem zweiten. Wir mußten konstatieren, daß biologisch eine Differenzierung zwischen Milch- und Colostrumproteinen nicht möglich war (s. Tab. II bis III).

Wir wurden also zu dem Schluß gedrängt, daß zum mindesten biologisch Milch- und Colostrumeiweißkörper einheitlicher Natur sind.

Milch, Colostrum und Blutserum.

Die nächste Frage mußte nun die sein, wie stehen die Molkeneiweißkörper der Milch und des Colostrums zu denen des Blutserums, ihrer Quelle. Frühere Versuche von Bauer[3]) hatten schon die hohe Wahrscheinlichkeit gebracht, daß die Proteine der Molke und des Serums sich biologisch nicht mehr differenzieren lassen. Bauereisen hatte diesen Befund bestätigt. Wir gingen nunmehr dazu über, mit den isolierten Proteinen noch zu arbeiten und eine Stichprobe mit dem Globulin zu machen. Der Versuch ergab tatsächlich die biologische Identität der Globuline aus dem Serum, dem Colostrum und der Milch.

Tabelle VI.
Hämolyse

bei Einwirkung von Rinderserum-Globulin-Antiserum 0,1 ccm auf 0,19%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Rinderserum-Globulin	Kuh-Colostrum-Globulin	Kuhmilch-Globulin
1/256	0	0	0
1/512	0	0	0
1/1024	mäßig	mäßig	mäßig
1/2048	fast komplett	fast komplett	stark
0	komplett	komplett	komplett

1) Sebelien, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 448, 1885.

2) Tiemann, ibid., 43, 282, 1898.

3) Bauer, Zur Biologie der Milch. Verhdl. d. Ges. f. Kinderh., Salzburg 1909.

Tabelle VII.
Hämolyse
bei Einwirkung von Rinderserum-Globulin-Antiserum 0,1 ccm
auf 0,19 %ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Kuhmilch-Globulin	Kuhmilch-Albumin	Kuhmilch-Casein
1	0	0	fast 0
1/2	0	0	mäßig
1/4	0	0	"
1/8	0	0	stark
1/16	0	0	"
1/32	0	0	komplett
1/64	0	fast 0	"
1/128	0	stark	"
1/256	0	komplett	"
1/512	0	"	"
1/1024	fast 0	"	"
1/2048	wenig	"	"
0	komplett	"	"

Damit sind wir zu dem Ergebnis gelangt, daß die Milchdrüse zu allen Zeiten der Lactation Eiweißkörper produziert, die sich durch die zurzeit empfindlichsten Methoden nicht voneinander differenzieren lassen, von denen man also mit Fug und Recht annehmen muß, daß sie identisch sind. Man könnte ja wohl den Einwand erheben, und er muß sicherlich auch noch experimentell geprüft werden, daß auch die Komplementablenkungsmethode nicht genüge, um verschiedene Globuline oder Albumin derselben Art voneinander zu scheiden. Nachdem sich aber ergeben hat, daß Proteine verschiedener Arten trotz hochgradigster chemischer Ähnlichkeit biologisch scharf trennbar sind, daß weiter selbst chemisch so verwandte Körper wie Albumin und Globulin derselben Art durch Komplementbindung exakt zu differenzieren gehen, müssen wir wohl das Versagen dieser Methode in unserem Falle zugunsten der wirklichen Identität der geprüften Proteine verwenden dürfen.

Zur Theorie der Milch- bzw. Colostralsekretion.

Wenn wir an der Identität des Albumins und Globulins von Milch, Colostrum und Serum festhalten, so gewinnen wir für die Theorie der Milch- und Colostralsekretion gewisse neue Unterlagen. Zunächst müßte man folgern, daß es sich in beiden Fällen,

bei der Milch und bei dem Colostrum, um prinzipiell identische, wenn auch quantitativ verschiedene Prozesse handelt.

Um diese Tatsache verständlich zu finden muß man daran denken, daß die Milch ein Produkt sekretorischer und exkretorischer Drüsenfunktion ist, daß gewisse Bestandteile u. a. Molkenproteine, Harnstoff u. a. m. unverändert dem Blute entnommen und ausgeschieden werden.

Der Unterschied zwischen Milch- und Colostrumbildung würde dann darin liegen, daß in dem einen Falle mehr die sekretorische, in dem andern die exkretorische Komponente der Drüsentätigkeit im Vordergrunde steht. Es liegt nahe, den Grund hierfür wiederum darin zu suchen, daß sich in der Colostralzeit Prozesse in der Brustdrüse abspielen, die der Entzündung zum mindesten nicht fern stehen, eine Idee, die schon Bab[1]) auf Grund morphologischer Studien ausgesprochen hat. Die chemische Zusammensetzung des Colostrums spricht im gleichen Sinne.

Ganz abgesehen davon, daß entzündete Membranen erfahrungsgemäß für Eiweißkörper durchlässiger sind und daß sich also auf diese Weise der hohe Eiweißgehalt des Colostrums erklären ließe, können wir ja alltäglich eine Beobachtung machen, die für unsere Theorie geradezu die Dignität eines von der Natur angestellten Experimentum crucis hat. Wenn nämlich in der voll lactierenden Brustdrüse wirkliche Entzündungen auftreten, so wird ein Sekret geliefert, das morphologisch, chemisch und biologisch dem Colostrum überaus nahesteht.

Wir erinnern daran, daß als erstes Kennzeichen der Mastitis reichliche Zellbestandteile auftreten, in dem Maße, daß man dieses Phänomen der Diagnostik nutzbar gemacht hat (Tromsdorff). Hierzu steht in Parallele der Zellgehalt des Colostrums.

Wir weisen ferner darauf hin, daß der Proteingehalt der Mastitismilch weit höher ist als der der Milch, sich also auch dem des Colostrums nähert. Aber damit ist es noch nicht genug. Auch das Verhältnis der einzelnen Eiweißkörper untereinander entspricht bei der Mastitis nicht mehr dem Typus der Milch,

[1]) Bab, Die Colostrumbildung als physiolog. Analogon zu Entzündungsvorgängen. Berlin 1904.

sondern dem des Colostrums, d. h. nicht das Casein, sondern die Menge des Albumins und Globulins ist stark angewachsen, und zwar vor allen Dingen die des Globulins. So finden wir unter den Zahlen von Sassenhagen folgende Werte für Colostrum und die Milch von gesunden und kranken Kühen (Mastitis):

	Mastitis I	Mastitis II	Milch	Colostrum
Gesamteiweiß	5,475	4,785	—	—
Albumin + Globulin .	2,45	2,945	0,39	8,53
Albumin	0,12	0,53	0,27	0,65
Globulin	*2,33*	*2,415*	*0,12*	*7,9*

Die Tabelle zeigt instruktiv, eine wie große prinzipielle Ähnlichkeit hinsichtlich der Relation der Molkenproteine zwischen Mastitismilch und Colostralmilch herrscht.

Was die biologischen gemeinsamen Charaktere der beiden letztgenannten Milcharten anbelangt, so weisen wir auf die Befunde von Bauer[1]) und seinem Mitarbeiter Sassenhagen[2]) hin. Diese Autoren stellten fest, daß ein nennenswerter Gehalt an Haptinen zwar nicht in normaler Milch, aber doch im Sekret der Tiere zu finden sei, die entweder eine Euterentzündung hatten, oder in den ersten Tagen der Lactation sich befanden.

Wir glauben berechtigt zu sein, in den angeführten Verwandtschaftszeichen zwischen Mastitismilch und Colostrum eine besonders starke Stütze für die Anschauung zu finden, daß bei der Bildung des Colostrums sich Vorgänge abspielen, die der Entzündung nahestehen. Wir machen diese letztere Einschränkung ganz mit Absicht, da „Entzündung" zunächst ein

[1]) Bauer, Zur Biologie des Colostrums. Deutsche med. Wochenschr. 1909.

[2]) Bauer und Sassenhagen, Ein neues Verfahren zum Nachweis der Mastitismilch. Med. Klinik 1909, Nr. 51. — Sassenhagen, Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- und Mastitismilch. Inaug.-Dissertation. Arch. f. Kinderheilk. 1910.

klinischer und anatomischer Begriff ist und sich ein diesbezügliches Substrat in der puerperalen Brustdrüse nicht findet.

Frauenmilch.

Als wir daran gingen, die Molkeneiweißkörper der Frauenmilch zu studieren, mußte uns zunächst die Frage beschäftigen, was für Proteine überhaupt in dieser Milchart zu finden sind. Näheres hierüber ist noch nicht bekannt. Ein Unterschied gegen die Kuhmilch wurde seinerzeit von Wroblewski nur dahin aufgestellt, daß er in der Essigsäuremolke von Frauencasein einen Eiweißkörper in größeren Mengen annahm, der in der Kuhmilch nur in Spuren vorkäme und den er nach dem optischen Verhalten seiner Lösungen „Opalisin" nannte. Wir mußten demgemäß zuerst nachprüfen, ob etwa ein Körper vom Charakter des Opalisins neben dem zu mutmaßenden Albumin und Globulin vorhanden sei. Die bezüglichen Vorarbeiten, über die demnächst berichtet werden wird, wurden von Engel (mit Eufinger[1]) ausgeführt. Sie brachten das Resultat, daß wohl ein Globulin und ein Albumin in der Frauenmilchmolke vorhanden sei, daß aber ein drittes Protein sich durch fraktionierte Fällung nicht darstellen läßt. Weiterhin war es notwendig, auch über die Mengenverhältnisse des Albumins und Globulins eine Vorstellung zu gewinnen. Die hierauf gerichteten Versuche wurden von Engel[2]) vorgenommen. Sie brachten den interessanten Befund, daß das Verhältnis des Albumins zum Globulin umgekehrt ist wie in der Kuhmilch, daß nämlich mehr Globulin wie Albumin vorhanden ist.

Die Reindarstellung der Frauenmilchmolkenproteine vollzog sich genau so, wie es oben für Kuhmilch angegeben ist, d. h. es wurde erst das Casein mit der Essigsäuremethode Engels[3]) abgeschieden und dann das Globulin aus der neutralisierten Molke durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Auf die Darstellung des Albumins mußten wir leider verzichten, weil nur Spuren vorhanden waren.

---

1) Noch nicht publiziert.

2) Noch nicht publiziert.

3) Engel, l. c.

Verhältnis von Casein zu Globulin und umgekehrt.

Prüfte man Globulinantisera mit Casein und Globulin, so ergab sich eine sehr starke spezifische Reaktion mit Globulin, eine sehr geringe mit Casein. Ein sehr wesentlicher Unterschied gegenüber der Kuhmilch war nicht vorhanden. Wandte man die umgekehrte Versuchsanordnung an, d. h. stellte man Casein-Antisera gegen Casein und Globulin ein, so dokumentierte sich auch hier, wie schon früher bei der Kuhmilch, ein weit geringerer Unterschied. Es erfolgte nämlich nicht nur mit dem Casein, sondern auch mit dem Globulin eine weitgehende Komplementbindung, wenn auch mit dem letzteren längst nicht so stark wie mit dem ersteren. Da man das Entstehen von Verwandtschaftsreaktionen überhaupt durch die Multiplizität der Receptoren erklärt, so müssen wir annehmen, daß das Casein-Antiserum mehr Receptoren gegen Globulin enthält als das Globulin-Antiserum deren gegen Casein. Offenbar muß man sich den Vorgang so vorstellen, daß Casein und Globulin neben den für sie individuell charakteristischen Gruppen mit antigener Eigenschaft auch noch solche enthalten, die beiden gemeinsam sind, nur mit dem Unterschiede, daß das Casein daran eine größere Zahl wie das Globulin enthält. Diese Annahme würde zwanglos erklären, daß ein Casein-Antiserum relativ stärker wirksam sein muß gegen Globulin als ein Globulin-Antiserum gegen Casein.

Tabelle VIII.

Hämolyse

von 0,1 ccm Frauenmilch-Globulin-Antiserum (196) auf 0,15%ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Frauenmilch-Globulin	Frauenmilch-Molke	Frauenmilch-Casein
1	0	0	0
1/2	0	0	fast 0
1/4	0	0	wenig
1/8	0	0	mäßig
1/16	0	fast 0	fast komplett
1/32	0	wenig	" "
1/64	0	mäßig	komplett
1/128	0	"	"
1/256	fast 0	stark	"
1/512	stark	fast komplett	"
1/1024	komplett	komplett	"
0	"	"	"

Tabelle IX.
Hämolyse
von 0,1 ccm Frauenmilch-Casein-Antiserum (169) auf 0,0025 %ige Eiweißlösungen von

Verdünnungen	Frauenmilch-Casein	Frauenmilch-Globulin	Frauenmilch-Molke
1	0	0	0
1/2	0	0	0
1/4	0	0	0
1/8	0	mäßig	stark
1/16	0	fast komplett	fast komplett
1/32	0	komplett	komplett
1/64	wenig	"	"
1/128	"	"	"
1/256	mäßig	"	"
1/512	fast komplett	"	"
0	komplett	"	"

Auf die spezielle Prüfung des Albumins mußten wir aus den oben angeführten Gründen verzichten. Nachdem sich aber bisher in den gegenseitigen Beziehungen von Casein und Globulin analoge Resultate wie bei der Kuhmilch ergeben haben, liegt es nahe, auch für das Albumin der Frauenmilch das gleiche anzunehmen. Wir kommen daher zu folgenden Resultaten.

Schlußsätze.

I. Zur allgemeinen Eiweißbiologie.

1. Mittels der Komplementbindungsmethode läßt sich Albumin und Globulin derselben Art voneinander exakt trennen.
2. Das Globulin ist biologisch wirksamer als das Albumin, d. h. es bildet besser Antikörper.

II. Zur Biologie der Milcheiweißkörper.

1. Die drei Milcheiweißkörper Casein, Albumin und Globulin lassen sich biologisch differenzieren.
2. Das Globulin steht dem Casein näher als das Albumin.
3. Globulin und Albumin sind trotz ihrer Differenzierbarkeit untereinander näher verwandt als mit dem Casein.
4. Durch die, wenn auch entferntere Verwandtschaft des Caseins mit den Molkenproteinen ist die biologische Methode

nicht ohne weiteres fähig, die chemische Methode der Caseinfällung zu kontrollieren.

5. Die Colostrumeiweißkörper verhalten sich untereinander wie die der Milch.

6. Die Colostrumeiweißkörper lassen sich biologisch von denen der Milch nicht trennen.

7. Das gleiche gilt auch von den Proteinen des Blutserums gegenüber denen der Molke aus Milch oder Colostrum.

8. Globulin und Albumin aus Serum, Milch und Colostrum scheinen also identisch zu sein.

9. Die Eiweißkörper der Frauenmilch, soweit sie geprüft wurden, d. h. also Casein und Globulin, verhalten sich untereinander wie die der Kuhmilch.

Beiträge zur Kenntnis des Komplementes.[1])

Von

H. Braun.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. Januar 1911.)

Das früher von Ferrata[2]) im hiesigen Laboratorium geübte Verfahren der Trennung der Komplementbestandteile durch Dialyse war zunächst das natürlich gegebene, da es ja zur Aufklärung der Tatsache angewandt worden war, daß die Komplementwirkung im salzarmen Medium unterbleibt.

Während Brand[3]) und Hecker[4]) mit dieser Methode weiterhin brauchbare Resultate erzielten, machten wir, wie auch andere Autoren, bei unseren Versuchen die Erfahrung, daß sich die Bedingungen der Versuche nicht vollständig beherrschen lassen. Neben gelungenen Versuchsreihen tauchten Störungen aller Art auf. Bald erschien das Mittelstück sehr stark abgeschwächt, bald war die Trennung unvollständig, so daß das Endstück allein Komplementwirkung zeigte, bald traten in kürzester Zeit die von Brand und Hecker beschriebenen Modifikationen des Mittelstückes auf, durch deren Kenntnis diese beiden Forscher ein großes Hindernis im Fortschritt auf diesem Gebiet beseitigt haben. Wir bemühten uns vergebens, durch Änderung der Dialysiermembran (Schleicher und Schüll), durch Innehaltung bestimmter Temperaturen, durch Beachtung bestimmter Dialysenzeiten, durch verschiedenartige

[1]) Die Versuche sind auf Veranlassung von Prof. Morgenroth, unter Benutzung der diesem aus der Gräfin Luise Bose-Stiftung bewilligten Mittel ausgeführt.

[2]) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 13.

[3]) Brand, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34.

[4]) Hecker, Arbeiten a. d. Inst. f. experim. Ther. 1907, Heft 3.

Vorbehandlung des Meerschweinchenserums konstante Resultate zu erhalten.

Wie wenig die Methode der Dialyse hohen Anforderungen an Konstanz entspricht, ergibt sich aus einer kurzen Mitteilung von Ferrata und Carpani. Sie beobachteten — was wir allerdings niemals sahen —, daß nach langdauernder Dialyse die gesamte komplettierende Wirkung auf das Sediment, das sonst nur das Mittelstück enthält, übergegangen ist.

Sachs und Altmann[1]) versuchten zuerst mit Erfolg die Trennung zu erzielen, indem sie das Serum durch verdünnte Salzsäure fällten. Auch hier sind die Versuchsbedingungen, die innegehalten werden müssen, außerordentlich enge, und es erschien uns daher geraten, an ein schonenderes Verfahren anzuknüpfen, nämlich an die Ausfällung durch Einleitung von Kohlensäure, das zuerst von Liefmann[2]) verwendet worden ist.

Nach zahlreichen Vorversuchen erkannten wir als optimal folgende Bedingungen:

Das Serum wird im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, wobei eine leichte Trübung eintritt. Das zur Verdünnung dienende Wasser sowie das Waschwasser, das später zum Waschen des Niederschlages verwendet wird, ist auf 0° abgekühlt, um Abschwächungen nach Möglichkeit zu vermeiden.

Der Kohlensäureniederschlag bietet gegenüber dem bei der Dialyse erhaltenen den Vorteil der fast glatten Löslichkeit.

Eine Umwandlung des Mittelstückes in die Brandsche Modifikation findet bei einigermaßen raschem Arbeiten nicht statt, wie wir in zahlreichen vergleichenden Versuchen fest stellten.

Trotzdem gingen wir bei der Prüfung in der Regel so vor, daß wir zu den Blutkörperchen zuerst das Mittelstück und erst nach $^1/_4$ bis 1 Stunde das Endstück zusetzten.

Wie sich aus unseren Protokollen ergibt, muß man auch hier öfters mit einer Abschwächung der komplettierenden Wirkung beider Komponenten rechnen, etwa auf die Hälfte oder $^1/_3$ des ursprünglichen Wertes. Aber mit dieser Ein-

[1]) Sachs und Altmann, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforsch. Kraus-Levaditi, 2.

[2]) Liefmann, Berl. klin. Wochenschr. 1908.

schränkung gibt das Verfahren, das den großen Vorteil der Schnelligkeit hat, konstante Resultate.

Unser Verfahren gestaltet sich im Detail folgendermaßen:

Frisches Meerschweinchenserum wird im Glaskolben mit der zehnfachen Menge eiskalten destillierten Wassers gemischt und danach Kohlensäure aus einer Bombe eingeleitet. Die in einigen Augenblicken entstehende Trübung erreicht bald ihr Maximum, und durch sofort sich anschließendes kurzes Zentrifugieren erhält man eine Abtrennung des Niederschlages von der klaren Flüssigkeit. Beide Anteile werden nun gesondert behandelt. Die Flüssigkeit, deren Reaktion stets deutlich sauer ist, wird durch ein doppeltes gehärtetes Papierfilter filtriert, um jede Spur fester Teilchen zu vermeiden, die sich beim Abgießen vom Niederschlag beimengen konnten, und dann nochmals mit Kohlensäure behandelt, um der Vollständigkeit der Ausfällung sicher zu sein. Durch entsprechenden Zusatz von 10%iger Kochsalzlösung wird die Flüssigkeit auf den physiologischen Salzgehalt gebracht, öfters kräftig geschüttelt und in einem weiten offenen Gefäße im Eisschrank einige Zeit stehen gelassen, um die Kohlensäure zu vertreiben.

Der Niederschlag wird zunächst in einem vielfachen Multiplum eiskalten destillierten Wassers aufgeschwemmt und zentrifugiert. Diese Prozedur wird wiederholt, so daß also eine 2malige Waschung erfolgt. Bis zur Verwendung und endgültigen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung wird der Niederschlag auf Eis aufbewahrt. Zur Auflösung in Kochsalzlösung nehmen wir von derselben stets das Doppelte der Serummenge, welcher der Niederschlag entspricht, weil die Schnelligkeit der Lösung dadurch gefördert wird. Werden mit dieser so erhaltenen Mittelstücklösung Bindungsversuche ausgeführt, so wird dieselbe zuvor durch Papier klar filtriert.

Im Anschluß an die Beschreibung unserer Methodik möchten wir einige Bemerkungen hinzufügen über die von Brand und Hecker beschriebene Modifikation des Mittelstückes in Kochsalzlösung, die auch wir zu beobachten Gelegenheit hatten, und die wir uns gegebenen Falles absichtlich dann erzeugten, wenn das Mittelstück sensibilisiertes Blut auflöste, was bei der Kohlensäuremethode hie und da zu beobachten ist. Unter sonst gleichen Bedingungen gelingt einmal die Trennung des Komplementes vollständig, während andere Male, besonders bei hohem Amboceptorgehalt, das Mittelstück allein löst. Ist es aber einige Stunden in Kochsalzlösung aufbewahrt worden, dann verliert es diese Eigenschaft.

Wir müssen ausdrücklich betonen, daß wir uns bei unseren Versuchen äußerst selten dieser Modifiation des Mittelstückes bedienten und dann dies stets im Protokolle vermerkten.

Versuch 1.

(18. VI. 10.)

Am 15. VI. wurden 5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses wurde in 10,0 ccm Kochsalzlösung gelöst, und beide Komponenten sind auf Komplettierbarkeit untersucht worden.

Nachher wurden sie im Frigo bis zum 18. VI. aufbewahrt, um nochmals untersucht zu werden.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1 fach lös. Dos. = 0,25 $^1/_{1000}$. Verwendet wurden 0,25 $^1/_{100}$ = 10 fach lös. Dos.

Ziegenblut 5 $^0/_{00}$, 2 mal gewaschen.

Versuch am 18. VI.

I. II. **Endstück und Mittelstück** für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

III. **Endstück + Mittelstück gleichzeitig:**

	Endstück	Mittelstück			
1.	1,0 Endstück	+ 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	wenig
2.	0,5 „	+ 0,1 „	(= 0,05 „)		Spur
3.	0,3 „	+ 0,6 $^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)		Spürchen
4.	0,2 „	+ 0,4 $^1/_{10}$ „	(= 0,02 „)		gelb
5.	0,1 „	+ 0,2 $^1/_{10}$ „	(= 0,01 „)		0, gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.				0, gelblich
7.	„ 2. „ „				0
8.	„ 3. „ „				0

IV. **Endstück** eine $^1/_2$ Stunde nach dem **Mittelstück** zugesetzt. Versuchsanordnung wie III.

	Endstück	Mittelstück			
1.	1,0 Endstück	+ 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ 0,1 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „	+ 0,6 $^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)		kompl. Lös., Schleier
4.	0,2 „	+ 0,4 $^1/_{10}$ „	(= 0,02 „)		mäßig
5.	0,1 „	+ 0,2 $^1/_{10}$ „	(= 0,01 „)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.				gelblich
7.	„ 2 „ „				0
8.	„ 3. „ „				0

V. **Endstück und Mittelstück** sofort nach der Darstellung am 15. VI. untersucht. Endstück gleichzeitig mit dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie III.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. „ „ Schleier
4. mäßig
5. gelb
6. gelb, Kuppe
7. gelblich, Zone
8. 0

Resultat: Aus dieser Versuchsanordnung geht hervor, daß das Mittelstück, in Kochsalzlösung aufbewahrt, derart verändert wurde, daß es mit dem Endstück erst dann wirksam reagierte, wenn ihm Gelegenheit geboten wurde, mit dem sensibilisierten Blute eine kurze Zeit zuvor in Reaktion zu treten.

Versuch 2.

(15. VI.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Am vorhergehenden Tage (14. VI.) dargestelltes Endstück und in Kochsalzlösung aufgelöstes Mittelstück, die im Eiswasser aufbewahrt waren, wurden zum Versuch herangezogen. Es sind also vorhanden:

1. Endstück vom 14. VI. (Endstück alt),
2. Mittelstück „ 14. „ (Mittelstück alt),
3. Endstück „ 15. „ (Endstück frisch),
4. Mittelstück „ 15. „ (Mittelstück frisch).

I. II. Endstück (frisch) und Mittelstück (frisch) für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

III. IV. Endstück (alt) und Mittelstück (alt) für sich allein mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

V. Endstück (frisch) gleichzeitig mit dem Mittelstück (frisch) + sensibiliertes Blut.

1. 1,0 Endstück	+ 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2. 0,5 „	+ 0,1 „	(= 0,05 „)		„ „
3. 0,3 „	+ 0,6 $^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)		fast kompl. Lös.
4. 0,2 „	+ 0,4 $^1/_{10}$ „	(= 0,02 „)		mäßig
5. 0,1 „	+ 0,2 $^1/_{10}$ „	(= 0,01 „)		Spürchen
6. wie 1. ohne Amboc.				Spur
7. „ 2. „ „				„
8. „ 3. „ „				Spürchen

VI. Endstück (alt) $^1/_4$ Stunde nach Mittelstück (alt) zugesetzt. Versuchsanordnung dieselbe wie in V.

1. fast kompl. Lös.
2. wenig
3. Spur
4. gelblich
5. 0
6. 0, Zone
7. 0, „
8. 0, Zönchen

VII. Endstück (alt) $^1/_4$ Stunde nach Mittelstück (frisch). Wie Reihe V.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4 sehr stark
5. Spürchen
6. gelblich, Zönchen
7. 0
8. 0

VIII Endstück (frisch) 1/4 Stunde nach Mittelstück (alt) zugesetzt. Wie Reihe V.

1 fast kompl. Lös.
2. stark
3. Spur
4. gelblich
5. 0
6. gelblich, Kuppe
7 0, Kuppe
8. 0, Zönchen

IX. Die Untersuchung des Endstücks (alt) und Mittelstücks (alt) am Tage ihrer Darstellung (14. VI.) ergab:

IXa. Endstück allein mit und ohne Amboceptor: Keine Hämolyse.

IXb. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor untersucht.

1. 0,5 Mittelstück	(= 0,25 Ser.)	mit Amboc.		fast kompl. Lös.
2. 0,25 „	(= 0,125 „)	„ „		wenig
3. 0,1 „	(= 0,05 „)	„ „		gelblich
4. wie 1.		ohne Amboceptor		gelblich
5. „ 2.		ohne Amboceptor		„
6. „ 3.		ohne Amboceptor		„

IXc. Endstück und Mittelstück gleichzeitig zugesetzt. Wie Reihe V.

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. „ „ „
5. wenig
6. wenig
7. Spur
8. gelblich

Resultat. Das Endstück erfährt, wenn es längere Zeit in Kochsalzlösung aufbewahrt wird, keine Abschwächung. Das in Kochsalzlösung längere Zeit aufbewahrte Mittelstück erweist sich dagegen, wenn das Endstück kurz nach diesem zugesetzt wird, in seiner Wirkung vermindert.

Bei der von uns angewandten Methode, bei der wir das Mittelstück unmittelbar vor dem Versuche herstellten, konnten

wir eine Veränderung des Mittelstückes nicht nachweisen. Zahlreiche vergleichende Versuche, von denen wir einen unter Versuch 3 anführen, zeigten uns keine Differenz in der Hämolysewirkung nach dem zu verschiedener Zeit erfolgten Zusatze von Endstück. Nie sahen wir eine Verstärkung der Hämolyse, wenn das Endstück statt sofort erst nach 1 oder 2 Stunden zugesetzt wurde. Dagegen beobachteten wir einmal — und wir führen deshalb das betreffende Protokoll (Versuch 4) ausführlich an — eine deutliche Abschwächuug der Hämolyse nach 2 Stunden im Vergleich zu derjenigen nach sofortigem Endstückzusatz. Es liegt die Annahme nahe, daß während der angeführten Zeit eine Umwandlung des Mittelstückes stattgefunden hatte, diese muß aber anderer Art gewesen sein als die von Brand und Hecker beschriebene.

Versuch 3.

(12. VIII. 10.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück ist in 10,0 ccm Kochsalzlösung unmittelbar vor Anstellung des Versuches aufgelöst worden.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. 0,25 $^1/_{1000}$ Verwendet 0,25 $^1/_{100}$ = 10fach lös. Dos.

Endstück wurde zu verschiedenen Zeiten nach dem Mittelstück zugesetzt, und zwar

A. sofort
B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „
D. „ 2 Stunden

I. II. Endstück und Mittelstück mit und ohne Amboceptor geprüft, zeigen keine Hämolyse.

A. Endstück gleichzeitig zugesetzt.

	Endstück	Mittelst.	(Endst. + Mittelst.)		
1.	1,0 Endstück	+ 0,2 Mittelst.	(Endst. + Mittelst. = 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ 0,1 „	(„ + „ = 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „	+ 0,6 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,03 „)		sehr stark
4.	0,2 „	+ 0,4 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,02 „)		Spur
5.	0,1 „	+ 0,2 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,01 „)		gelblich
6.	wie 1. ohne Amboc.				gelblich
7.	„ 2. „ „				„
8.	„ 3. „ „				„

B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „
D. „ 2 Stunden
} wie A

Resultat: Keine Verstärkung der Hämolyse nach späterem Endstückzusatz.

Versuch 4.

(14. VI. 10.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Das letztere in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5 %, 2 mal gewaschen.

Amboceptor vom 23. IV. 1 fach lös. Dos. = 0,25 $^1/_{1000}$. Verwendet wurden 0,25 $^1/_{100}$ = 10 fach lös. Dos.

Das Endstück ist zu verschiedenen Zeiten nach dem Mittelstück zugesetzt worden, und zwar:

A. gleichzeitig
B. nach $^1/_2$ Stunde
C. „ 1 „
D. „ 2 Stunden

I. **Endstück** zeigt mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

II. **Mittelstück** auf Hämolyse geprüft.

1.	0,5 Mittelstück	(= 0,25 Ser.) mit Amboc.	fast kompl. Lös.
2.	0,25 „	(= 0,125 „) „ „	wenig
3.	0,1 „	(= 0,05 „) „ „	gelblich
4.	wie 1. ohne Amboc.		gelblich
5.	„ 2. „ „		„
6.	„ 3. „ „		„

A. Endstück **gleichzeitig** mit dem Mittelstück zugesetzt:

1.	1,0 Endstück + 0,2 Mittelst.	(Endst. + Mittelst. = 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ + 0,1 „	(„ + „ = 0,05 „)		„ „
3.	0,3 „ + 0,6 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,03 „)		f. kompl. Lös.
4.	0,2 „ + 0,4 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,02 „)		„ „ „
5.	0,1 „ + 0,2 $^1/_{10}$ „	(„ + „ = 0,01 „)		wenig
6.	wie 1. ohne Amboc.			wenig
7.	„ 2. „ „			Spur
8.	„ 3. „ „			gelblich

B. Endstück nach $^1/_2$ Stunde nach Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1.	kompl. Lös.
2.	„ „
3.	fast kompl. Lös.
4.	stark
5.	wenig
6.	wenig
7.	gelblich
8.	„

C. Endstück 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1. kompl. Lös.
2. fast kompl. Lös.
3. sehr stark
4. wenig
5. gelblich

6. gelb
7. gelblich
8. „

D. Endstück 2 Stunden nach dem Mittelstück zugesetzt. Versuchsanordnung wie A.

1. kompl. Lös., Schleier
2. sehr stark
3. wenig
4. „
5. gelblich

6. gelblich
7. „
8. „

IV. Das native Meerschweinchenserum als Komplement.

1.	$1{,}0\,^1/_{10}$ mit Amboc.	kompl. Lös.
2.	$0{,}5\,^1/_{10}$ „ „	„ „
3.	$0{,}3\,^1/_{10}$ „ „	kompl. Lös., Schleier
4.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „ „	fast kompl. Lös.
5.	$0{,}1\,^1/_{10}$ „ „	sehr stark
6.	$1{,}0\,^1/_{10}$ ohne Amboc.	Zone

Resultat: Während des 2stündigen Aufenthaltes im Brutschrank ist das Mittelstück alteriert worden.

Wir hatten diese Versuche zur Kontrolle ausgeführt, da für quantitatives Arbeiten eine unkontrollierbare Umwandlung eine große Fehlerquelle bedeuten würde. Doch spielt diese, wie die Versuche zeigen, bei unserer Methodik keine Rolle.

I.

Unser Bestreben war zunächst darauf gerichtet, die quantitativen Verhältnisse zwischen Mittelstück und Endstück im Meerschweinchenserum zu untersuchen, um dadurch eine Basis für die Beurteilung anderer Sera zu gewinnen.

Wir gingen davon aus, und fanden dies auch durch die Ergebnisse unserer Versuche bestätigt, daß die Auffassung, der

auch die unter Leitung Morgenroths entstandene Arbeit von Ferrata folgte, daß nämlich die bei der Trennung resultierenden Anteile sich im genuinen Serum wirklich als eine Einheit, das Komplement, darstellen, nicht frei von einem gewissen Vorurteil ist. Geht man ganz unbefangen an die Betrachtung heran, so kann man die Möglichkeit nicht von der Hand weisen, daß das „Komplement" als solches überhaupt nicht existiert und daß die Funktionen, die man bisher dem Komplement zuschrieb, gemeinschaftliche Funktionen des von Brand sogenannten Mittelstückes und Endstückes darstellen. Auch Liefmann und Cohn[1]) haben schon beiläufig die Vermutung ausgesprochen, daß im nativen Serum die beiden Komponenten getrennt nebeneinander vorhanden sind. Der Entwicklungsprozeß, der sich hier vollzieht, ist ganz analog demjenigen, dem nach Entdeckung der Amboceptoren der Buchnersche Begriff des Alexins unterlag. Auch danach mußten die cytolytischen Vorgänge, die zunächst auf der Wirkung einer einheitlichen Substanz zu beruhen schienen, auf zwei wesentlich verschiedene Substanzen zurückgeführt werden. Es ist jedenfalls bis auf weiteres günstiger für eine unbefangene Erforschung des Komplements, wenn man das Mittelstück und Endstück als von Anfang an getrennte und auch getrennt wirkende Faktoren ansieht. Um nicht eine unnötige Komplikation der Terminologie zu schaffen, behalten wir die Bezeichnung Mittelstück und Endstück bei, obwohl wir nicht glauben, daß für die Annahme der von Brand und Hecker vertretenen Anschauung über die Beziehungen zwischen beiden zwingende Gründe vorliegen.

Unsere Aufmerksamkeit war vor allem darauf gerichtet, zu untersuchen, ob normalerweise die beiden Komponenten stets in äquivalenten Verhältnissen vorkommen, oder ob die eine derselben isoliert oder wenigstens in bedeutendem relativem Überschuß zu finden ist. In unlösbarem Zusammenhang damit steht die gleichzeitig anzuschneidende Frage, ob Mittelstück resp. Endstück verschiedener Spezies sich gegenseitig vertreten können.

---

[1]) Liefmann und Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 6, Nr 1, 2/3; 7, Nr. 6; 8, Nr. 1.

Prinzipiell ist diese Frage von Landsteiner[1]), Liefmann und Guggenheimer[2])[3]) bejahend beantwortet worden, und auch wir finden das, soweit unsere Untersuchungen reichen, bestätigt. Unabhängig ist auch Marks[4]) zu analogen Ergebnissen gelangt. Diese Autoren haben aber keine quantitativ-vergleichenden Untersuchungen angestellt.

Man darf sich nicht verhehlen, daß die Grundlagen für quantitative Versuche keine besonders exakten sind.

Bringt man bei Meerschweinchenserum, nachdem man sich in der angegebenen Weise Lösungen von Mittelstück und Endstück gesondert hergestellt hat, die beiden Komponenten zusammen unter Anwendung von 5 Amboceptoreinheiten, so sieht man, daß die ursprüngliche Komplementwirkung nicht mehr erhalten ist. In III. der nachfolgenden Tabelle (Versuch 5) ist eine Einstellung des genuinen Meerschweinchenserums enthalten; 0,03 ccm führen zur kompletten Lösung.

Mischt man, wie es in IV geschieht, die beiden Anteile so, daß die Gemische bestimmten Mengen des ursprünglichen Serums entsprechen, so stimmt die komplettlösende Dosis mit 0,05 des Komplements überein. Die Reihen V und VI zeigen nun, daß bei einem Überschuß an Endstück (entsprechend 0,1 ccm ursprünglichen Serums) der zur vollständigen Hämolyse notwendige Bedarf an Mittelstück sinkt, nämlich auf eine Menge, die 0,025 Serum entspricht. Analog ist das Verhältnis bei der umgekehrten Versuchsanordnung in der Reihe VI. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die weiteren Versuche, in denen 20 bis 50 Amboceptoreinheiten in Anwendung kamen (Versuch 5 bis 8). Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch Liefmann und Cohn. Man darf wohl aus den Versuchen 5 bis 8, in denen sich Beziehungen zwischen den beiden Komponenten ergeben, die mit den von Morgenroth und Sachs beschriebenen quantitativen Beziehungen zwischen Amboceptor und Komplement Ähnlichkeit

---

[1]) Landsteiner, Centralbl. f. Bakt., Ref. Abt. I, 47.

[2]) Nachtrag zur Korrektur. Die interessanten Untersuchungen von Guggenheimer sind während der Drucklegung unserer Publikation erschienen und konnten daher nicht die gebührende Berücksichtigung finden. Das gleiche gilt von der Arbeit von Marks (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 4).

[3]) H. Guggenheimer, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 3.

[4]) H. R. Marks, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, Nr. 4.

haben, den Schluß ziehen, daß im Meerschweinchenserum Mittelstück und Endstück in einigermaßen äquivalentem Verhältnis vorhanden sind. Eine richtige Beleuchtung erhält diese funktionelle Messung erst durch die Verhältnisse, wie sie sich bei Sera anderer Tierspezies ergeben.

Versuch 5.

(21. IV. 10.)

4,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Mittelstück in 8,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. 0,5 $^1/_{1000}$. Verwendet wurden 0,25 $^1/_{100}$ = 5fach lös. Dos.

Das Endstück ist eine halbe Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt worden.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft:

1.	2,0 Endst.	(=0,2 Ser.)	+0,0 Kslg.	+0,25 $^1/_{100}$ Amb.	+1,0 Blut	sehr schwach gelbl. (Aggl.)
2.	1,0 „	(=0,1 „)	+1,0 „	+ „	+ „	do.
3.	2,0 „	(=0,2 „)	+0,25 „	+ 0	+ „	gelblich
4.	1,0 „	(=0,1 „)	+1,25 „	+ 0	+ „	„

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft:

1.	0,4 Mittelst.	(=0,2 Ser.)	+1,6 Kslg.	+0,25 $^1/_{100}$ Amb.	+1,0 Blut	Spur (Aggl.)
2.	0,2 „	(=0,1 „)	+1,8 „	+ „	+ „	gelbl. („)
3.	0,1 „	(=0,05 „)	+1,9 „	+ „	+ „	„ („)
4.	0,4 „		+1,85 „	+ 0	+ „	0
5.	0,2 „		+2,05 „	+ 0	+ „	0
6.	0,1 „		+2,15 „	+ 0	+ „	0

III. Das native Meerschweinchenserum als Komplement:

1.	1,0 $^1/_{10}$ Serum	+ 1,0 Kslg.	+0,25 $^1/_{100}$ Amboc.	+1,0 Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 $^1/_{10}$ „	+ 1,5 „	+ „	+ „	„
3.	0,3 $^1/_{10}$ „	+ 1,7 „	+ „	+ „	„ Schleier
4.	0,2 $^1/_{10}$ „	+ 1,8 „	+ „	+ „	sehr stark
5.	0,1 $^1/_{10}$ „	+ 1,9 „	+ „	+ „	wenig
6.	1,0 $^1/_{10}$ „	+ 1,25 „	+ 0,0	+ „	Kuppe
7.	—	+ 2,0 „	+0,25 $^1/_{100}$ Amboc.	+ „	0 (Agglutination)
8.	—	+ 2,25 „	+ 0,0	+ „	0

IV. In der folgenden Versuchsreihe wurde das Endstück mit dem Mittelstück in Mengen zusammengetan, die den Komplementmengen in III. entsprechen.

Das Endstück wurde $^1/_2$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .	$^1/_2$ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2.	0,1 Mittelstück (=0,05 Ser.) + 1,4 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„ „
3.	0,6 $^1/_{10}$ Mittelst. (=0,03 Ser.) + 1,1 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,3 „ (= 0,03 „)	sehr stark
4.	0,4 $^1/_{10}$ Mittelst. (=0,02 Ser.) + 1,4 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,2 „ (= 0,02 „)	stark
5.	0,2 $^1/_{10}$ Mittelst. (=0,01 Ser.) + 1,7 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,1 „ (= 0,01 „)	Spur
6.	wie 1. + 1,05 Kslg. + 0 + 1,0 Blut		+ 1,0 „	gelbl., Zone
7.	„ 2. + 1,65 „ + 0 + „		+ 0,5 „	gelblich
8.	„ 3. + 1,35 „ + 0 + „		+ 0,3 „	„

V. Konstante Mengen von Endstück und absteigende Quantitäten von Mittelstück.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .	$^1/_2$ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2.	0,1 Mittelstück (= 0,05 Ser.) + 0,9 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	„ „
3.	0,05 Mittelst. (= 0,025 Ser.) + 0,95 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	„ „
4.	0,02 Mittelst. (= 0,01 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	sehr stark
5.	0,01 Mittelst. (= 0,005 Ser.) + 0,9 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ „ „	mäßig
6.	wie 1. + 1,05 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut		+ „ „	Kuppe
7.	„ 2. + 1,15 „ + 0 + „		+ „ „	„
8.	„ 3. + 1,2 „ + 0 + „		+ „ „	Zone

VI. Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 0,8 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .	$^1/_2$ Stunde bei 37°	+ 1,0 Endst. (=0,1 Ser.)	kompl. Lös.
2.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,3 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „ (=0,05 „)	„
3.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,55 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,25 „ (=0,025 „)	„ Schleier
4.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,7 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,1 „ (=0,01 „)	sehr stark
5.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,75 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amb. + 1,0 Blut . . .		+ 0,05 „ (=0,005 „)	mäßig
6.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,05 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 1,0 „	Zone
7.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,55 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 0,5 „	gelblich
8.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,8 Kslg. + — + 1,0 Blut . . .		+ 0,25 „	„

Resultat: Das Komplement ist durch die Spaltung auf ein Drittel der ursprünglichen Wirkung abgeschwächt.

Endstück und Mittelstück ersetzen sich gegenseitig bei der Hämolyse.

Versuch 6.

(20. VII. 10.)

Derselbe Versuch wie 5. Endstück und Mittelstück aus frischem Meerschweinchenserum dargestellt.

Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. 0,5 $^1/_{1000}$. Verwendet wurde 0,1 $^1/_{100}$ = 20fach lös. Dos.

I. und II. Endstück und Mittelstück zeigen mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1.	1,0 $^1/_{10}$ Ser.	+ Amboceptor + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 $^1/_{10}$ „		„ „
3.	0,3 $^1/_{10}$ „		„ „
4.	0,2 $^1/_{10}$ „		fast „ „
5.	0,1 $^1/_{10}$ „		wenig
6.	1,0 $^1/_{10}$ ohne Amboc.		0
7.	0,1 $^1/_{10}$ Amboc.		0
8.	Blut allein		0

IV. Endstück und Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. (Wie Vers. 5, IV.)

1.	0,2 Mittelstück + 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ + 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	0,6 $^1/_{10}$ „ + 0,3 „	(= 0,03 „)		„ „
4.	0,4 $^1/_{10}$ „ + 0,2 „	(= 0,02 „)		stark
5.	0,2 $^1/_{10}$ „ + 0,1 „	(= 0,01 „)		gelb
6.	wie 1. ohne Amboc.			gelblich
7.	„ 2. „ „			„
8.	„ 3. „ „			∅

V. Konstante Mengen von Endstück und absteigende von Mittelstück. (Wie Vers. 5, V.)

1.	0,2 Mittelst. (= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endst. (0,1 Meerschw.-Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ (= 0,05 „)	+ „		„ „
3.	0,05 „ (= 0,025 „)	+ „		„ „
4.	0,02 „ (= 0,01 „)	+ „		mäßig
5.	0,01 „ (= 0,005 „)	+ „		wenig
6.	wie 1. ohne Amboc.			gelblich, Zone
7.	„ 2. „ „			„ „
8.	„ 3. „ „			„ „

VI. Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	} +Amboc.+Blut	kompl. Lös.
2.	„ + 0,5 „ (= 0,05 „)		„ „
3.	„ + 0,25 „ (= 0,025 „)		fast „ „
4.	„ + 0,1 „ (= 0,01 „)		wenig
5.	„ + 0,05 „ (= 0,005 „)		gelblich

6. wie 1. ohne Amboc. gelblich
7. „ 2. „ „ „
8. „ 3. „ „ „

Resultat: I. Das gespaltene Komplement erscheint dem nativen gegenüber nur wenig abgeschwächt.

II. 1. 0,2 $^{1}/_{10}$ Mittelstück + 0,1 Endstück: keine Hämolyse (gelb)
2. 0,2 $^{1}/_{10}$ „ + 1,0 „ mäßige „
3. 0,2 ccm „ + 0,1 „ wenig „

Mittelstück und Endstück können sich also gegenseitig ersetzen. Insbesondere kann durch größere Endstückmengen die Lösung verstärkt werden.

Versuch 7.

(21. VI. 10.)

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Mittelstück in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Versuchanordnung wie im Versuch 5 mit der Ausnahme, daß das Endstück eine Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt wurde.

Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. 0,5 $^{1}/_{1000}$. Verwendet wurde 0,1 $^{1}/_{100}$ = 20fach lös. Dos.

Gesamtvolumen 3,1 ccm. Versuchsanordnung wie Versuch 5.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft:

1. 2,0 Endstück mit Amboc. gelblich, (Aggl.)
2. 1,0 „ „ „ „ „

3. 2,0 Endstück ohne Amboc. ∅
4. 1,0 „ „ „ ∅

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor geprüft.

1. 0,4 Mittelstück mit Amboc. Spur
2. 0,2 „ „ „ gelblich
3. 0,1 „ „ „ 0

4. 0,4 Mittelstück ohne Amboc. 0
5. 0,2 „ „ „ 0
6. 0,1 „ „ „ 0

III. Das native Meerschweinchenserum als Komplement. (Wie Vers. 5, III.)

1. $1,0\,^1/_{10}$ Meerschweinchenserum		+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2. $0,5\,^1/_{10}$	„		„ „
3. $0,3\,^1/_{10}$	„		„ „
4. $0,2\,^1/_{10}$	„		fast kompl. Lös.
5. $0,1\,^1/_{10}$	„		mäßig
6. $1,0\,^1/_{10}$			gelblich
7. —$0,1\,^1/_{10}$ Amboc. allein			0, Aggl.
8. — Blut allein			Ø

IV. **Endstück plus Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen.**

Endstück eine Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1. 0,2 Mittelstück	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Kompl.)	mit Amboc. und Blut	kompl. Lös.
2. 0,1 „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3. $0,6\,^1/_{10}$ „	+ 0,3 „	(= 0,03 „)		sehr stark
4. $0,4\,^1/_{10}$ „	+ 0,2 „	(= 0,02 „)		mäßig
5. $0,2\,^1/_{10}$ „	+ 0,1 „	(= 0,01 „)		gelblich
6. wie 1.	+ 1,0 „		ohne Amboc.	gelblich, Kuppe sehr schwach
7. „ 2.	+ 0,5 „			gelbl., Zönchen
8. „ 3.	+ 0,3 „			sehr schw. gelbl.

V. **Konstante Mengen von Endstück und absteigende Quantitäten von Mittelstück.**

1. 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endst. (= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2. 0,1 „	(= 0,05 „)	+ „		„ „
3. 0,05 „	(= 0,025 „)	+ „		„ „
4. 0,02 „	(= 0,01 „)	+ „		stark
5. 0,01 „	(= 0,005 „)	+ „		mäßig
6. wie 1. ohne Amboc.				gelblich, Zone
7. „ 2. „ „				„ „
8. „ 3. „ „				gelblich, Zönchen

VI. **Konstante Mittelstückmenge mit absteigender Quantität von Endstück.**

1. 0,2 Mittelstück (0,1 Ser.)	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2. „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3. „	+ 0,25 „	(= 0,025 „)		sehr stark
4. „	+ 0,1 „	(= 0,01 „)		wenig
5. „	+ 0,05 „	(= 0,005 „)		gelblich
6. wie 1. ohne Amboc.				gelblich, Kuppe
7. „ 2. „ „				gelblich
8. „ 3. „ „				0

Resultat: I. Das gespaltene Komplement ist auf $^1/_3$ des ursprünglichen Wertes abgeschwächt.

1. $0,2\,^1/_{10}$ Mittelstück	+ 0,1 Endstück:	keine Hämolyse
2. $0,2\,^1/_{10}$ „	+ 1,0 „	starke „
3. 0,2 ccm „	+ 0,1 „	wenig „

Versuch 8.

(21. VII. 10.)

Analoge Versuchsanordnung wie im Versuch 5.

Ziegenblut $5\,^0/_0$, 2mal gewaschen.

Ziegenblut-Kaninchen-Amboceptor vom 23. IV. (1fach lös. Dos. $0{,}5\,^1/_{1000}$). Verwendet wurden $0{,}25\,^1/_{10} = 50$fach lös. Dos.

I. Endstück allein mit und ohne Amboceptor:

1.	2,0 Endstück (= 0,2 Ser.)	mit Amboc.	gelblich
2.	1,0 „ (= 0,1 „)	„ „	„
3.	2,0 „	ohne „	„
4.	1,0 „	„ „	„

II. Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor:

1.	0,4 Mittelstück (= 0,2 Ser.)	mit Amboc.	mäßig
2.	0,2 „ (= 0,1 „)	„ „	wenig
3.	0,1 „ (= 0,05 „)	„ „	gelblich
4.	wie 1. ohne Amboc.		0
5.	„ 2. „ „		0
6.	„ 3. „ „		0

III. Natives Meerschweinchenserum als Komplement:

1.	$1{,}0\,^1/_{10}$ Meerschweinchen	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	$0{,}5\,^1/_{10}$ „		„ „
3.	$0{,}3\,^1/_{10}$ „		„ „
4.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „		kompl. Lös., Schleier
5.	$0{,}1\,^1/_{10}$ „		mäßig
6.	$1{,}0\,^1/_{10}$ „	ohne Amboc.	sehr schw. gelblich
7.	Amboc. allein		0
8.	Blut „		0

IV. Endstück und Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in III entsprechen.

1.	0,2 Mittelstück + 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ + 0,5 „ (= 0,05 „)		„ „
3.	$0{,}6\,^1/_{10}$ „ + 0,3 „ (= 0,03 „)		f. kompl. Lös.
4.	$0{,}4\,^1/_{10}$ „ + 0,2 „ (= 0,02 „)		stark
5.	$0{,}2\,^1/_{10}$ „ + 0,1 „ (= 0,01 „)		Spürchen
6.	wie 1. ohne Amboceptor		sehr schwach gelblich
7.	„ 2.		0
8.	„ 3.		0

V. Endstück konstant, Mittelstück absteigend.

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.) + 1,0 Endstück (= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ (= 0,05 „) + 1,0 „ (= 0,1 „)		„ „
3.	0,05 „ (= 0,025 „) + 1,0 „ (= 0,1 „)		kompl. Lös., Schleier
4.	0,02 „ (= 0,01 „) + 1,0 „ (= 0,1 „)		sehr stark
5.	0,01 „ (= 0,005 „) + 1,0 „ (= 0,1 „)		mäßig
6.	wie 1.		gelblich, Zone
7.	„ 2.		gelblich
8.	„ 3.		„

VI. Endstück absteigend, Mittelstück konstant:

1.	0,2 Mittelstück (= 0,1 Ser.)	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Ser.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,2 „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3.	0,2 „	+ 0,25 „	(= 0,025 „)		„ „
4.	0,2 „	+ 0,1 „	(= 0,01 „)		mäßig
5.	0,2 „	+ 0,05 „	(= 0,005 „)		sehr wenig
6.	wie 1.				gelblich
7.	„ 2.				„
8.	„ 3.				0

Resultat: I. Gespaltenes Komplement stark abgeschwächt.

II. 1. $0,2^1/_{10}$ Mittelstück + 0,1 ccm Endstück: Spürchen Hämolyse
2. $0,2^1/_{10}$ „ + 1,0 „ „ sehr starke „
3. 0,2 ccm „ + 0,1 „ „ mäßige „

Endstück und Mittelstück können vikariierend für einander eintreten. Endstück vermag dies in höherem Grade als Mittelstück.

Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf Sera anderer Tierspezies erschien schon deshalb notwendig, weil sich die bisherigen Studien mit Ausnahme einiger kurz mitgeteilter Versuche von Liefmann, Landsteiner, Guggenheimer ausschließlich auf das Meerschweinchenserum beschränkt haben, das auch zweifellos besonders für die Begründung der Methodik das weitaus günstigste Objekt darstellt. Nachdem sich, wie aus den folgenden Versuchen ersichtlich ist, gezeigt hatte, daß Endstück und Mittelstück verschiedener Tierspezies (Meerschweinchen-Kaninchen) vikariierend für einander eintreten können, konnte man sich der Komponenten des Meerschweinchenserums bedienen, um mit Hilfe derselben die korrespondierenden Komponenten anderer Sera festzustellen. Hierzu war es nicht jedesmal notwendig, Mittelstück und Endstück der zu untersuchenden Sera isoliert darzustellen, sondern, wie weiterhin ersichtlich ist, genügte es, durch einfache Ergänzungsversuche das Vorhandensein der einen der beiden Komponenten zur Anschauung zu bringen.

Eine Ausnahme machten wir nur mit dem Kaninchenserum. Wir untersuchten dieses unter Verwendung des gewohnten Amboceptors, indem wir, wie beim Meerschweinchenserum, das Mittelstück durch Kohlensäurefällung, das Endstück aber, um die starke Verdünnung desselben zu vermeiden, nebstdem noch durch Dialyse gewannen. Wir lassen nun die Protokolle unserer beiden Versuche folgen.

Versuch 9.

(25. VI. 10.)

6,0 ccm frischen Kaninchenserums wurden im Fischblasenkondom 24 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert, filtriert und das Filtrat (= 8,0 ccm) mit 10%iger Kochsalzlösung isotonisch gemacht und als „Kaninchenendstück durch Dialyse gewonnen“ verwendet.

5,0 ccm Kaninchenserum wurden mittels Kohlensäure in Mittelstück und Endstück gespalten.

Das Mittelstück wurde in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Gleichzeitig ist frisches Meerschweinchenserum (15,0 ccm) mittels Kohlensäure in Mittelstück und Endstück gespalten worden. Das Mittelstück wurde in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Das Endstück ist im folgenden Versuche ½ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt worden.

Ziegen-Kaninchen-Ambozeptor vom 23. IV. 1fach lös. Dos. 0,5 $^1/_{1000}$. In Anwendung kam 0,25 $^1/_{100}$ = 5fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

I. Prüfung der Endstücke auf Hämolyse:

	Meerschweinchenendstück	Kan.-Endstück CO_2	Kan.-Endstück d. Dialyse
1. 2,0 Endstück + 0,0 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	gelbl.	gelbl.	gelbl.
2. 1,0 Endstück + 1,0 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	„	„	„
3. 2,0 Endstück + 0,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut .	„	„	„
4. 1,0 „ + 1,25 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„	„

II. Prüfung der Mittelstücke auf Hämolyse:

	Meerschweinchenmittelstück	Kaninchenmittelstück
1. 0,5 Mittelstück + 1,5 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	mäßig	gelblich
2. 0,25 Mittelstück + 1,75 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	Spur	„
3. 0,1 Mittelstück + 1,9 Kslg. + 0,25 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	gelblich	„
4. 0,5 Mittelstück + 1,75 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut .	„	„
5. 0,25 „ + 2,0 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„
6. 0,1 „ + 2,15 „ + 0,0 + 1,0 „ .	„	„

III. Prüfung der nativen

	Meer-schweinchen	Kaninchen
1. 1,0 1/10 Serum + 1,0 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	kompl. Lös.	f. kompl. Lös.
2. 0,5 1/10 Serum + 1,5 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	„ „	gelblich
3. 0,3 1/10 Serum + 1,7 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	f. kompl. Lös.	„
4. 0,2 1/10 Serum + 1,8 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	sehr stark	„
5. 0,1 1/10 Serum + 1,9 Kslg. + 0,25 1/100 Amboc. + 1,0 Blut	wenig	„

IV. Endstück und Mittelstück derselben Spezies und in Kombination mit dem-
Reihe III entsprechen.

1. 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Komplement)	+ 0,8 Kslg.	+	0,25 1/100 Amboc.	+ 1,0 Blut	1/2 Stunde bei 37°
2. 0,1 „	(= 0,05 „)	+ 1,4 „	+	„ „	+ 1,0 „	
3. 0,6 1/10 „	(= 0,03 „)	+ 1,1 „	+	„ „	+ 1,0 „	
4. 0,4 „ „	(= 0,02 „)	+ 1,4 „	+	„ „	+ 1,0 „	
5. 0,2 „ „	(= 0,01 „)	+ 1,7 „	+	„ „	+ 1,0 „	
6. wie 1.		+ 1,05 „	+	0,0	+ 1,0 „	
7. „ 2.		+ 1,65 „	+	0,0	+ 1,0 „	
8. „ 3.		+ 1,35 „	+	0,0	+ 1,0 „	

Resultat: Das Endstück des Kaninchenserums ist durch die Spaltung unwirk-
jenigen im Meerschweinchenserum. Da sich das genuine Kaninchenserum komplement-

Versuch 10.

(29. VI.)

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums und 7,0 ccm frischen Kaninchenserums wurden in angegebener Weise mittels Kohlensäure in Endstück und Mittelstück gespalten.

Sera auf Komplement:

	Meerschweinchen	Kaninchen
6. 1,0 $^{1}/_{10}$ Serum + 1,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	gelblich	wenig
7. 0,5 $^{1}/_{10}$ Serum + 1,75 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	—	gelblich
8. 0,3 $^{1}/_{10}$ Serum + 1,95 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	—	"
9. — + 2,0 Kslg. + 0,25 $^{1}/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	0	—
10. — + 2,25 Kslg. + 0,0 + 1,0 Blut	0	—

jenigen der anderen Tierart, in Mengenverhältnissen, die den Komplementmengen in

	Meerschweinchen-endstück + Meerschweinchen-mittelstück	Kohlensäure-Kaninchenendstück + Kaninchen-mittelstück	Kaninchenendstück durch Dialyse + Kaninchenmittel-stück	Kaninchenendstück durch Dialyse + Meerschweinchen-mittelstück	Meerschweinchen-endstück + Kaninchenmittel-stück
+ 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös.	Spürchen	gelblich	wenig	kompl. Lös.
+ 0,5 " (= 0,05 ")	do., Schleier	gelblich	"	gelblich	do., Schleier
+ 0,3 " (= 0,03 ")	stark	"	"	"	stark
+ 0,2 " (= 0,02 ")	"	"	"	"	mäßig
+ 0,1 " (= 0,01 ")	Spur	"	"	"	gelblich
+ 1,0 " (= 0,1 ")	gelblich	"	"	"	sehr stark
+ 0,5 " (= 0,05 ")	"	"	"	"	Spur
+ 0,3 " (= 0,03 ")	"	"	"	"	gelb

sam geworden. Der Gehalt an Mittelstück im Kaninchenserum entspricht etwa dem-ärmer zeigt, so kann dies nur in der Endstückmenge seinen Grund haben.

Das Meerschweinchenmittelstück wurde in 20,0 ccm, das Kaninchenmittelstück in 14,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5 %, 2 mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 10. V. 1 fach lös. Dos. 0,25 $^{1}/_{100}$. Verwendet wurde 0,25 $^{1}/_{10}$ = 10 fach lös. Dos.

Das Endstück wurde $^{1}/_{2}$ Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

I. II. Die beiden Endstücke und Mittelstücke für sich allein auf Hämolyse geprüft, erwiesen sich als inaktiv.

Versuchsanordnung wie im Versuch 7, Reihe I und II.

III. Prüfung der nativen Sera auf Komplement.

	Meer-schweinchen-serum	Kaninchen-serum
1. 1,0 $^1/_{10}$ Serum + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 1,0 Kslg. + 1,0 Blut	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2. 0,5 $^1/_{10}$ Serum + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 1,5 Kslg. + 1,0 Blut	„ „	mäßig
3. 0,3 $^1/_{10}$ Serum + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 1,7 Kslg. + 1,0 Blut	f. kompl. Lös.	Spur
4. 0,2 $^1/_{10}$ Serum + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 1,8 Kslg. + 1,0 Blut	sehr stark	∅
5. 0,1 $^1/_{10}$ Serum + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 1,9 Kslg. + 1,0 Blut	mäßig	∅
6. 1,0 $^1/_{10}$ Ser. + — + 1,25 Kslg. + 1,0 Blut	gelblich	mäßig
7. 0,5 „ „ + — + 1,75 „ + 1,0 „	—	0
8. 0,3 „ „ + — + 1,95 „ + 1,0 „	—	0
9. — + 0,25 $^1/_{10}$ Amboc. + 2,0 Kslg. + 1,0 Blut	∅	—
10. — + — + 2,25 Kslg. + 1,0 Blut . . .	∅	—

IV. Endstück und Mittelstück derselben Spezies und in Kombination mit dem Reihe III entsprechen.

1. 0,2 Mittelstück	(= 0,1 Kompl.)	+ 0,8 Kslg.	+ 0,25 $^1/_{10}$ Amboc.	+ 1,0 Blut	$^1/_2$ Stunde bei 37°
2. 0,1 „	(= 0,05 „)	+ 1,4 „	+ „ „	+ 1,0 „	
3. 0,6 $^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)	+ 1,1 „	+ „ „	+ 1,0 „	
4. 0,4 „ „	(= 0,02 „)	+ 1,4 „	+ „ „	+ 1,0 „	
5. 0,2 „ „	(= 0,01 „)	+ 1,7 „	+ „ „	+ 1,0 „	
6. wie 1.		+ 1,05 „	+ 0,0	+ 1,0 „	
7. „ 2.		+ 1,65 „	+ 0,0	+ 1,0 „	
8. „ 3.		+ 1,35 „	+ 0,0	+ 1,0 „	

Resultat: Das Endstück des Kaninchenserums ist durch die Spaltung abstück wie das Meerschweinchenserum.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß der Nachweis von Mittelstück und Endstück, wenn man die beiden Anteile des Kaninchenserums nach der Trennung wieder zusammenfügt, als mißlungen anzusehen wäre — ein gleiches Ergebnis, wie es Tsurusaki[1]) beim dialysierten Hunde- und Ziegenserum erhielt —, daß dagegen das Mittelstück, wenn man sich zur Ergänzung des Meerschweinchenserums als Endstück bedient, in ziemlich reichlicher Menge, etwa entsprechend dem Vorkommen im Meerschweinchenserum, nachweisbar ist. Man darf hieraus wohl den Schluß ziehen, daß das Endstück, das ja zweifellos im frischen Kaninchenserum vorhanden ist, bei den zur Trennung führenden Prozeduren eine Modifikation oder Abschwächung erfährt, durch die es dem Nachweis entzogen wird. Bekanntlich erscheint das Kaninchenserum bei allen Aktivierungsversuchen weit komplementärmer als das Meerschweinchenserum. Da nach unseren Versuchen der Gehalt der Kaninchensera am Mittelstück hinter dem des Meerschweinchenserums kaum zurücksteht, so darf man diese Erscheinung darauf zurückführen, daß im Kaninchenserum keine Äquivalenz zwischen Mittelstück und Endstück, sondern ein erheblicher Defekt des letzteren vorhanden ist.

jenigen der anderen Tierart in Mengenverhältnissen, die den Komplementmengen in

	Meerschweinchenendstück + Meerschweinchenmittelstück	Kaninchenendstück + Kaninchenmittelstück	Meerschweinchenendstück + Kaninchenmittelstück	Kaninchenendstück + Meerschweinchenmittelstück
+ 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös.	Ø	kompl. Lös.	gelblich
+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„ „	Ø	sehr stark	Ø
+ 0,3 „ (= 0,03 „)	sehr stark	Ø	stark	Ø
+ 0,2 „ (= 0,02 „)	wenig	Ø	wenig	Ø
+ 0,1 „ (= 0,01 „)	schwach gelb	Ø	gelblich	Ø
+ wie 1.	Spur	Ø	mäßig	gelblich
+ „ 2.	„	Ø	wenig	Ø
+ „ 3.	gelblich	Ø	gelblich	Ø

geschwächt. Das untersuchte Kaninchenserum enthält ungefähr genau soviel Mittel-

[1]) Tsurusaki, diese Zeitschr. 10, Heft 4 bis 6.

Man bestimmt also bei der üblichen Aktivierungsmethode im Falle des Kaninchenserums tatsächlich nicht den Gehalt desselben an Komplement, sondern den Gehalt an Endstück, ein Fehler, der den meisten bisherigen Bestimmungen dieser Art anhaften dürfte.

Zur Untersuchung der quantitativen Verhältnisse der Komplementbestandteile in anderen Normalseris bedienten wir uns der Sera von Ziege, Hammel, Rind, Hund und Mensch. Wir gingen dabei — wie schon oben erwähnt — so vor, daß wir das native Serum, ohne es zuvor zu spalten, mit dem sensibilisierten Blute einmal mit Meerschweinchenendstück, dann mit Meerschweinchenmittelstück zusammen digerierten.

Wir lassen nun ausführlich einige Protokolle unserer Versuche folgen. Zunächst diejenigen, die das Ziegen-, Hammel-, Rind- und Hundeserum betreffen.

Versuch 11.

(11. VIII. 10.)

Untersuchung der Sera von Ziege, Hammel, Rind und Hund auf ihren Gehalt an Mittelstück und Endstück.

Die Sera sind frisch. Sie wurden nativ dem sensibilisierten Blute zugesetzt und einmal mit Meerschweinchenendstück, das andere Mal mit Meerschweinchenmittelstück ergänzt, je nachdem, ob auf Endstück oder Mittelstück geprüft werden sollte. Um Vergleichswerte und die Bedingungen konstant zu erhalten, wurde dieselbe Methodik wie beim gespaltenen Meerschweinchenserum angewandt.

Wenn das native Serum auf Mittelstück geprüft werden sollte, so wurde es zunächst mit gleichem Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und dann in derselben Weise verfahren wie beim Meerschweinchenmittelstück, das wir ja gleichfalls in der doppelten Menge von Kochsalzlösung gelöst haben, als dem ursprünglichen Ausgangsvolum des Serums entsprach.

Bei der Prüfung auf Endstück wurde die Verdünnung 1:10 des Serums nach 1 Stunde dem sensibilisierten Blute + Meerschweinchenmittelstück zugesetzt.

Die Details sind aus den Versuchsprotokollen zu ersehen.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden mittels Kohlensäure gespalten. Das Mittelstück in 20,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenserum vom 11. VIII.

Hammelserum }
Rinderserum } vom 10. VIII.
Hundeserum }

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1 fach lös. Dos. = $0,5\,{}^1/_{1000}$. Im Versuch $0,5\,{}^1/_{100}$ = 10 fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2 mal gewaschen.

I. II. Meerschweinchenendstück und Meerschweinchenmittelstück, mit und ohne Amboceptor geprüft, zeigen keine Hämolyse. (Nur 0,5 ccm Mittelstück + Amboceptor: Spur.)

Versuchsanordnung wie Versuch 9, I und II.

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Versuch 9, III.

1.	$1,0\,{}^1/_{10}$	kompl. Lös.
2.	$0,5\,{}^1/_{10}$	„ „
3.	$0,3\,{}^1/_{10}$	fast kompl.
4.	$0,2\,{}^1/_{10}$	sehr stark
5.	$0,1\,{}^1/_{10}$	Spur

6. $1,0\,{}^1/_{10}$ sehr schwach gelblich
7. Amboc. allein: ∅, Agglutination[1])
8. Blut allein: ∅

IV. Meerschweinchenendstück mit Meerschweinchenmittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen.

1. 0,2 Mittelstück (= 0,1 Kompl.) + 0,8 Kslg. + $0,5\,{}^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+ 1,0 Endst. (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös.
2. 0,1 Mittelst. (= 0,05 Kompl.) + 1,4 Kslg. + $0,5\,{}^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ 0,5 „ (= 0,05 „)	„ „
3. $0,6\,{}^1/_{10}$ Mittelst. (= 0,03 Kompl.) + 1,1 Kslg. + $0,5\,{}^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ 0,3 „ (= 0,03 „)	sehr stark
4. $0,4\,{}^1/_{10}$ Mittelst. (= 0,02 Kompl.) + 1,4 Kslg. + $0,5\,{}^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ 0,2 „ (= 0,02 „)	wenig
5. $0,2\,{}^1/_{10}$ Mittelst. (= 0,01 Kompl.) + 1,7 Kslg. + $0.5\,{}^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ 0,1 „ (= 0,01 „)	sehr schwach gelblich
6. wie 1. + 1,30 Kslg. + — + 1,0 Blut		+ 1,0 „	gelb
7. „ 2. + 1,9 „ + — + 1,0 „		+ 0,5 „	0
8. „ 3. + 1,60 „ + — + 1,0 „		+ 0,3 „	0

[1]) Diese ist selbstverständlich in allen Proben mit Amboceptor eingetreten. Vermerkt wurde sie in diesen Protokollen nur dort, wo sie besonders intensiv war.

V. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum auf Hämolyse Verdünnung 1:10 untersucht.

1.	1,0 konz. Serum (Hundeserum $^1/_{10}$)	+ 1,5 Kochsalzlösung	+ 1,0 Blut	. . . . . .
2.	0,5 do.	+ 2,0 „	+ 1,0 „	. . . . . .
3.	0,25 do.	+ 2,25 „	+ 1,0 „	. . . . . .
4.	0,1 do.	+ 2,4 „	+ 1,0 „	. . . . . .
5.	0,05 do.	+ 2,45 „	+ 1,0 „	. . . . . .

VI. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mit Amboceptor in der Verdünnung 1:10.

1.	1,0 konz. Serum (Hundeserum $^1/_{10}$)	+ 1,0 Kochsalzlös.	+ 0,5 $^1/_{10}$ Amboc.	+ 1,0 Blut
2.	0,5 do.	+ 1,5 „	+ 0,5 $^1/_{10}$ „	+ 1,0 „
3.	0,25 do.	+ 1,75 „	+ 0,5 $^1/_{10}$ „	+ 1,0 „
4.	0,1 do.	+ 1,9 „	+ 0,5 $^1/_{10}$ „	+ 1,0 „
5.	0,05 do.	+ 1,95 „	+ 0,5 $^1/_{10}$ „	+ 1,0 „

VII. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mit Meer- und Mittelstück tritt hierbei Hämolyse auf.

1.	1,0 konz. Serum (Hundes. 1:10)	+ 1,5 Kslg.	+ 1,0 Blut	1 St. bei 37°	+ 1,0 Meerschw.-Endstück
2.	0,5 do.	+ 2,0 „	+ 1,0 „		+ 1,0 „
3.	0,25 do.	+ 2,25 „	+ 1,0 „		+ 1,0 „ (= 0,1 Kompl.)
4.	0,1 do.	+ 2,4 „	+ 1,0 „		+ 1,0 „
5.	0,05 do.	+ 2,45 „	+ 1,0 „		+ 1,0 „

VIII. Untersuchung des Rinderserums, Hammelserums, Ziegenserums und Hunde-

1.	0,2 Serumverdünnung 1:12 (= 0,1 Ser.)	+ 0,8 Kslg.	+ 0,5 $^1/_{100}$ Amboc.	+ 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°
2.	0,1 „ 1:12 (= 0,05 „)	+ 1,4 „	+ „ „	+ „	
3.	0,6 Serumverdünnung 1:20 (= 0,03 „)	+ 1,1 „	+ „ „	+ „	
4.	0,4 „ 1:20 (= 0,02 „)	+ 1,4 „	+ „ „	+ „	
5.	0,2 „ 1:20 (= 0,01 „)	+ 1,7 „	+ „ „	+ „	
6.	wie 1.	+ 1,30 „	+ 0	+ „	
7.	„ 2.	+ 1,9 „	+ 0	+ „	
8.	„ 3.	+ 1,60 „	+ 0	+ „	

geprüft. Die ersteren 3 wurden in konzentriertem Zustande, das Hundeserum in der

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
Spur, starke Aggl.	gelblich	gelblich	fast kompl. Lös.
gelblich, starke Aggl.	sehr schwach gelb	0	gelb
„ „ „	0	0	sehr schwach gelblich
sehr schwach gelblich	0	0	0
∅	0	0	0

auf Hämolyse geprüft. Die ersten 3 in konzentriertem Zustande, das Hundeserum

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
wenig, Aggl.	Spur, Aggl.	wenig, Aggl.	kompl. Lös.
gelblich, Aggl.	gelblich, Aggl.	„ „	mäßig
„ „	0, Aggl.	Spur, „	gelblich
„ „	0, „	∅, Aggl.	sehr schwach gelblich
schwach gelblich, Aggl.	0, „	∅, „	∅

schweinchenendstück zusammen untersucht. Bei Anwesenheit von Normalamboceptoren

Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
wenig, Aggl.	gelblich	gelblich	fast kompl. Lös.
„ „	„	0	Spur
stark, „	„	0	gelblich
fast kompl. Lös.	„	0	sehr schwach gelblich
„ „ „	„	0	∅

serums auf Mittelstück. Sera nativ. Als Endstück dient gefälltes Meerschweinchenserum.

	Rinderserum	Hammel-serum	Ziegenserum	Hundeserum
+ 1,0 Endst. (= 0,1 Meersch.)	f. kompl. Lös., starke Aggl.	wenig, Aggl.	mäßig, Aggl.	kompl. Lös.
+ 0,5 „	wenig, starke Aggl.	Spürchen, Aggl.	große Kuppe, Aggl.	„
+ 0,3 „	gelblich, Aggl.	gelblich, Aggl.	Zone, Aggl.	stark
+ 0,2 „	„ „	„ „	„ „	wenig
+ 0,1 „	sehr schwach gelblich, Aggl.	0, „	gelblich, Aggl.	gelblich
+ wie 1.	kompl. Lös.	gelblich	gelblich	f. kompl. Lös.
+ „ 2.	mäßig, starke Aggl.	„	„	Kuppe
+ „ 3.	sehr schwach gelblich	„	sehr schwach gelblich	gelblich

IX. Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum und Hundeserum mittels Ambo-
Das Rinderserum, Hammelserum, Ziegenserum wurden in der Verdünnung 1:10

1.	0,2 Meerschw.-Mittelstück	(= 0,1 Ser.)	+ 0,8 Kslg.	+	$0,5^1/_{100}$ Amboc.	+	1,0 Blut	1 Stunde bei 37°
2.	0,1 „	(= 0,05 „)	+ 1,4 „	+	„ „	+	„	
3.	$0,6^1/_{10}$ „	(= 0,03 „)	+ 1,1 „	+	„ „	+	„	
4.	$0,4^1/_{10}$ „	(= 0,02 „)	+ 1,4 „	+	„ „	+	„	
5.	$0,2^1/_{10}$ „	(= 0,01 „)	+ 1,7 „	+	„ „	+	„	
6.	wie 1.		+ 1,3 „	+	0	+	„	
7.	„ 2.		+ 1,9 „	+	0	+	„	
8.	„ 3.		+ 1,6 „	+	0	+	„	

Versuch 12.

(12. VIII. 10.)

Versuch 11 wurde wiederholt mit dem Unterschiede, daß vom Amboceptor $0,15^1/_{10}$ ccm = 30fach lös. Dos. verwendet wurde. Als Endstück und Mittelstück diente frisch gefälltes Meerschweinchenserum. Versuchsanordnung dieselbe wie im Versuche 11.

Rinderserum, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum vom vorigen Tage im Frigo aufbewahrt.

I. Meerschweinchenendstück mit und ohne Amboceptor zeigt keine Hämolyse.

II. Meerschweinchenmittelstück auf Hämolyse geprüft:

1.	0,4 Meerschw.-Mittelst.	+ 1,6 Kslg.	+	$0,15^1/_{10}$ Amboc.	+	1,0 Blut	wenig
2.	0,2 „	+ 1,8 „	+	„	+	„	Spürchen
3.	0,1 „	+ 1,9 „	+	„	+	„	gelblich
4.	0,4 „	+ 1,75 „	+	0	+	„	0
5.	0,2 „	+ 1,95 „	+	0	+	„	0
6.	0,1 „	+ 2,05 „	+	0	+	„	0

III. Meerschweinchenserum als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1.	$1,0^1/_{10}$ Serum	+ Amboceptor + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ „		„ „
3.	0,3 „ „		„ „
4.	0,2 „ „		„ „ Schleier
5.	0,1 „ „		sehr stark
6.	$1,0^1/_{10}$ ohne Amboc.		gelblich
7.	$0,15^1/_{10}$ Amboc. allein		0. Agglutination[1])
8.	Blut allein		0

[1]) Im Protokoll nur dort vermerkt, wo ohne Amboceptor vorhanden oder besonders intensiv.

ceptor und Meerschweinchenmittelstück im nativen Zustande auf Endstück untersucht. verwendet, das Hundeserum dagegen in der Verdünnung 1:100.

	Rinderserum 1/10	Hammelserum 1/10	Ziegenserum 1/10	Hundeserum 1/100
+ 1,0 1/10 Serum resp. 1,0 1/100 Hundeser.)	gelblich, starke Aggl.	0, Aggl.	gelblich, Aggl.	Spürchen
+ 0,5 1/10 Serum	sehr schwach gelblich, Aggl.	0, „	0, Aggl.	gelblich
+ 0,3 1/10 „	0, Aggl.	0, „	0, „	0
+ 0,2 1/10 „	0, „	0, „	0, „	0
+ 0,1 1/10 „	0, „	0, „	0, „	0
+ wie 1.	0	0	0	0
+ „ 2.	0	0	0	0
+ „ 3.	0	0	0	0

IV. Meerschweinchenendstück plus Mittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. Versuchsanordnung wie Vers. 5, IV.

1. 0,2 Mittelstück	+ 1,0 Endstück	(= 0,1 Komplement)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2. 0,1 „	+ 0,5 „	(= 0,05 „)		„ „
3. 0,6 1/10 „	+ 0,3 „	(= 0,03 „)		fast „ „
4. 0,4 1/10 „	+ 0,2 „	(= 0,02 „)		sehr stark
5. 0,2 1/10 „	+ 0,1 „	(= 0,01 „)		Spürchen
6. wie 1. ohne Amboc.				gelblich
7. „ 2. „ „				sehr schw. gelbl.
8. „ 3. „ „				0

V. Rinderserum, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum auf Hämolyse geprüft. Versuchsanordnung dieselbe wie Vers. 11, V. Die Sera sind dieselben wie im Vers. 11 (Frigo).

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum 1/10
1. 1,0 Konz.	Spürchen, starke Aggl.	gelblich	gelb	mäßig
2. 0,5 „	gelb, starke Aggl.	sehr schwach gelblich	gelblich	gelblich
3. 0,25 „	gelblich, starke Aggl.	do.	sehr schwach gelblich	sehr schwach gelblich
4. 0,1 „	sehr schwach gelbl.	0	0	0
5. 0,05 „	0	0	0	0

VI. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum mit 30fach lös. Dos. von Amboceptor auf Komplement untersucht. Die ersten drei in konzentriertem Zustande, das Hundeserum in Verdünnung 1:10. Versuchsanordnung analog Vers. 11, VI.

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
1. 1,0 Ser. + 0,15 $^1/_{10}$ Amb.	sehr wenig, starke Aggl.	gelblich	Spürchen	kompl. Lös.
2. 0,5 „ + „	gelblich, starke Aggl.	sehr schwach gelblich	gelblich	mäßig
3. 0,25 „ + „	do.	do.	sehr schwach gelb	wenig
4. 0,1 „ + „	sehr schwach gelblich, starke Aggl.	0	0	gelblich
5. 0,05 „ + „	0, starke Aggl.	0	0	sehr schwach gelblich

VIII. Untersuchung des Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserums auf

1. 0,2 Serumverdünnung 1:12 (= 0,1 Serum)	+ 0,8 Kslg.	+ 0,15 $^1/_{10}$ Amboc.	+ 1,0 Blut	$^1/_2$ Stunde bei 37°
2. 0,1 „ „ (= 0,05 „)	+ 1,4 „	+ „	+ „	
3. 0,6 „ 1:20 (= 0,03 „)	+ 1,1 „	+ „	+ „	
4. 0,4 „ „ (= 0,02 „)	+ 1,4 „	+ „	+ „	
5. 0,2 „ „ (= 0,01 „)	+ 1,7 „	+ „	+ „	
6. wie 1.	+ 0,95 „	+ 0	+ „	
7. „ 2.	+ 1,55 „	+ 0	+ „	
8. „ 3.	+ 1,25 „	+ 0	+ „	

IX. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum auf Endstück mittels Ambo- 1:100, die übrigen Sera 1:10.

1. 0,2 Meerschweinchenmittelst. (= 0,1 Ser.)	+ 0,8 Kslg.	+ 0,15 $^1/_{10}$ Amb.	+ 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°
2. 0,1 „ (= 0,05 „)	+ 1,4 „	+ „	+ „	
3. 0,6 $^1/_{10}$ „ (= 0,03 „)	+ 1,1 „	+ „	+ „	
4. 0,4 $^1/_{10}$ „ (= 0,02 „)	+ 1,4 „	+ „	+ „	
5. 0,2 $^1/_{10}$ „ (= 0,01 „)	+ 1,7 „	+ „	+ „	
6. wie 1.	+ 0,95 „	+ 0	+ „	
7. „ 2.	+ 1,55 „	+ 0	+ „	
8. „ 3.	+ 1,25 „	+ 0	+ „	

VII. Rinder-, Hammel-, Ziegen- und Hundeserum mit Meerschweinchenendstück untersucht. Bei Vorhandensein von Normalamboceptoren und Mittelstück tritt Lösung ein. Versuchsanordnung wie Vers. 11, VII.

	Rinderserum konz.	Hammelserum konz.	Ziegenserum konz.	Hundeserum $^1/_{10}$
1, 1,0 Ser. + 1,0 Endst.	mäßig, starke Aggl.	gelblich	gelb	mäßig
2. 0,5 „ + „	„ „ „	„	gelblich	Spürchen
3. 0,25 „ + „	stark, „ „	„	„	gelblich
4. 0,1 „ + „	„ „ „	schwach gelblich	„	0
5. 0,05 „ + „	Spur, „ „	„ „	„	0

Mittelstück. Sera nativ. Als Endstück dient gefälltes Meerschweinchenserum.

	Rinderserum	Hammelserum	Ziegenserum	Hundeserum
+ 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	kompl. Lös. (Aggl. d. Stromata u. Erythrocyten sehr stark[1])	stark	f. kompl. Lös.	kmpl. Lös.
+ 0,5 „ (= 0,05 „)	sehr stark	wenig	stark	sehr stark
+ 0,3 „ (= 0,03 „)	wenig	gelblich	mäßig	mäßig
+ 0,2 „ (= 0,02 „)	Spürchen	„	Spur	wenig
+ 0,1 „ (= 0,01 „)	gelblich	sehr schwach gelblich	gelb	gelb
+ wie 1.	mäßig, Aggl.	gelblich	sehr schwach gelblich	mäßig
+ „ 2.	gelblich, „	sehr schwach gelblich	do.	Spur
+ „ 3.	sehr schwach gelbl.	0	„	gelblich

ceptor und Meerschweinchenmittelstück untersucht. Hundeserum in der Verdünnung

	Rinderserum $^1/_{10}$	Hammelserum $^1/_{10}$	Ziegenserum $^1/_{10}$	Hundeserum $^1/_{100}$
+ 1,0 $^1/_{10}$ Serum (resp. $^1/_{100}$ Hundeser.)	Spürchen	gelblich	0	wenig
+ 0,5 „ „	sehr schwach gelbl.	0	0	gelblich
+ 0,3 „ „	0	0	0	0
+ 0,2 „ „	0	0	0	0
+ 0,1 „ „	0	0	0	0
+ wie 1.	sehr schwach gelbl.	0	0	0
+ „ 2.	do.	0	0	0
+ „ 3.	„	0	0	0

[1]) Röhrchen wurden öfters geschüttelt.

Überblicken wir die Resultate dieser Versuche, so ergibt sich folgendes:

Der Gehalt der einzelnen Sera an wirksamem Mittelstück ist ein verschiedener, doch ist in allen diese Komplementkomponente nachweisbar. Dagegen zeigt sich ein Defekt an Endstück. Wir begegnen also hier ähnlichen Verhältnissen wie beim Kaninchenserum. Und selbst in Seris, in denen reichlich Endstück vorhanden ist (im Hundeserum und, wie in nachstehenden Versuchen 13 und 14 gezeigt wird, im Menschenserum), zeigt sich ein Prävalieren des Mittelstückes.

Versuch 13.

(20. VII. 10.)

Untersuchung von Menschenserum auf Mittelstück und Endstück.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Das Mittelstück in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1 fach lös. Dos. $0{,}5^1/_{1000}$. Im Versuch verwendet $0{,}1\,^1/_{100} = 20$ fach lös. Dos.

Ziegenblut 5%, 2 mal gewaschen.

2 Menschensera.

Das Endstück wurde 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

I. II. Meerschweinchenendstück und Meerschweinchenmittelstück zeigen mit und ohne Amboceptor keine Hämolyse.

III. Meerschweinchenserum nativ als Komplement. Versuchsanordnung wie Vers. 5, III.

1.	$1{,}0\,^1/_{10}$ Kompl. + $0{,}1\,^1/_{100}$ Amboc.	+ Amboceptor + Blut	kompl. Lös.
2.	0,5 „ „ + „		„ „
3.	0,3 „ „ + „		„ „
4.	0,2 „ „ + „		f. kompl. Lös.
5.	0,1 „ „ + „		wenig
6.	$1{,}0\,^1/_{10}$ Kompl. ohne Amboc.		0
7.	$0{,}1\,^1/_{100}$ Amboc. allein		0
8.	1,0 Blut allein		0

IV. Meerschweinchenendstück plus Meerschweinchenmittelstück in Mengen, die den Komplementmengen in Reihe III entsprechen. Versuchsanordnung wie Vers. 5, IV.

1.	0,2 Mittelstück + 1,0 Endstück (= 0,1 Kompl.)	+ Amboc. + Blut	kompl. Lös.
2.	0,1 „ + 0,5 „ (= 0,05 „)		„ „
3.	$0{,}6\,^1/_{10}$ „ + 0,3 „ (= 0,03 „)		„ „
4.	0,4 „ „ + 0,2 „ (= 0,02 „)		stark
5.	0,2 „ „ + 0,1 „ (= 0,01 „)		gelb
6.	wie 1. ohne Amboc.		gelblich
7.	„ 2 „ „		0
8.	„ 3. „ „		0

V. Menschensera 1 und 2 ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft. Versuchsanordnung wie Vers. 11, V.

	Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser.	stark	wenig
2. 0,5 „ „	mäßig	gelblich
3. 0,25 „ „	wenig	0
4. 0,1 „ „	gelblich	0
5. 0,05 „ „	0	0

VI. Menschensera 1 und 2 mit Amboceptor auf Hämolyse geprüft. Wie Vers. 11, VI.

	Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. = 10fach lös. Dos.	f. kompl. Lös.	mäßig
2. 0,5 „ „ + do.	mäßig	wenig
3. 0,25 „ „ + do.	Spur	gelblich
4. 0,1 „ + do.	sehr schwach gelblich	0
5. 0,05 „ + do.	0	0

VII. Menschensera 1 und 2 mit Meerschweinchenendstück und ohne Amboceptor untersucht. Wie Vers. 11, VII.

			Menschenserum 1	Menschenserum 2
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenserum	1 Std. bei 37°	+ 1,0 Meerschweinchenendstück	kompl. Lös.	f. kompl. Lös.
2. 0,5 „ „		+ 1,0 „	„ „	wenig
3. 0,25 „ „		+ 1,0 „	sehr stark	Spürchen
4. 0,1 „ „		+ 1,0 „	Spur	gelblich
5. 0,05 „ „		+ 1,0 „	gelb	„

VIII. Menschensera 1 und 2 mit Amboceptor und Meerschweinchenendstück auf Mittelstück untersucht. Analoge Versuchsanordnung wie Vers. 11, VIII.

1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,0 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+ 1,0 Endstück vom Meerschweinchen
2. 0,5 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,5 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ do.
3. 0,25 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,75 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ do.
4. 0,1 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,9 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ do.
5. 0,05 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,95 Kslg. + 0,1 $^1/_{100}$ Amboc. + 1,0 Blut		+ do.

Resultat:

	Menschen-serum 1	Menschen-serum 2
1.	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2.	„ „	sehr stark
3.	mäßig	mäßig
4.	wenig	wenig
5.	Spürchen	Spur

IX. Menschensera 1 und 2 mittels Amboceptor und Meerschweinchenmittelstück auf Endstück untersucht. Wie Vers. 11, IX.

					Menschen-serum 1	Menschen-serum 2
1.	0,2 Meerschw.-Mittelst.	+ 0,8 Kslg.	+ 0,1 $^{1}/_{100}$ Amb.	+ 1,0 Blut	1 Stunde bei 37°	+ 1,0 $^{1}/_{10}$ Ser.	komplette Lös.	mäßig
2.	0,1 „	+ 1,4 „	+ „	+ „		+ 0,5 „ „	f. kompl. Lös.	wenig
3.	0,6 $^{1}/_{10}$ „	+ 1,1 „	+ „	+ „		+ 0,3 „ „	mäßig	gelblich
4.	0,4 „ „	+ 1,4 „	+ „	+ „		+ 0,2 „ „	wenig	sehr schw. gelblich
5.	0,2 „ „	+ 1,7 „	+ „	+ „		+ 0,1 „ „	gelblich	0
6.	wie 1.	+ 0,9 „	+ 0	+ „		+ wie 1.	f. kompl. Lös.	gelblich
7.	„ 2.	+ 1,5 „	+ 0	+ „		+ „ 2.	mäßig	„
8.	„ 3.	+ 1,2 „	+ 0	+ „		+ „ 3.	Spur	0

Versuch 14.

Versuchsanordnung wie Vers. 13.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 1. VI. 1 fach lös. Dos. 0,25 $^{1}/_{100}$. Verwendet wurden 0,75 $^{1}/_{10}$ = 30fach lös. Dos.

Menschensera 3 und 4.

I. Meerschweinchenendstück mit und ohne Amboceptor: keine Hämolyse.

II. Meerschweinchenmittelstück zeigt starke Hämolyse, weshalb die entsprechenden Versuche mit demselben nicht angestellt wurden.

III. Menschensera 3 und 4 auf Hämolyse untersucht. Wie Vers. 11, V.

		Menschen-serum 3	Menschen-serum 4
1. 1,0 $^{1}/_{10}$ Menschenserum	ohne Amboc.	stark	wenig
2. 0,5 „ „		wenig	Spürchen
3. 0,25 „ „		Spürchen	0
4. 0,1 „ „		0	0
5. 0,05 „ „		0	0

IV. Menschensera 3 und 4 mit Ambozeptor (30fach lös. Dos.) geprüft. Wie Vers. 13, VI.

	Menschen-serum 3	Menschen-serum 4
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser. + 0,75 $^1/_{10}$ Amboc.	wenig, Aggl.	gelblich, Aggl.
2. 0,5 " " + " "	gelblich	sehr schwach gelbl. Aggl.
3. 0,25 " " + " "	sehr schwach gelblich	0, "
4. 0,1 " " + " "	0	0, "
5. 0,05 " " + " "	0	0, "

V. Menschenserum 3 und 4 ohne Immunamboceptor mit Meerschweinchenendstück auf Mittelstückgehalt untersucht. Wie Vers. 11, VII.

			Menschen-serum 3	Menschen-serum 4
1. 1,0 $^1/_{10}$ Menschenser.	1 Std. bei 37°	+ 1,0 Endstück	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2. 0,5 " "		+ " "	" "	" "
3. 0,25 " "		+ " "	" "	stark
4. 0,1 " "		+ " "	sehr wenig	gelblich
5. 0,05 " "		+ " "	sehr schwach gelb	∅

VI. Menschensera 3 und 4 mit Immunamboceptor und Meerschweinchenendstück auf Mittelstückgehalt geprüft. Wie Vers. 11, VIII.

1. 1,0 $^1/_{10}$ Mensch.-Serum	+ 0,0 Kslg.	+ 0,75 $^1/_{10}$ Amb.	+ 1,0 Blut	1 Std. bei 37°	+ 1,0 Endst.
2. 0,5 " do.	+ 0,5 "	+ "	+ "		+ " "
3. 0,25 " do.	+ 0,75 "	+ "	+ "		+ " "
4. 0,1 " do.	+ 0,9 "	+ "	+ "		+ " "
5. 0,05 " do.	+ 0,95 "	+ "	+ "		+ " "

Resultat:

	Menschen-serum 3	Menschen-serum 4
1.	kompl. Lös.	kompl. Lös.
2.	" "	" "
3.	" "	" "
4.	" "	" "
5.	" "	f. kompl. Lös.

Zwei Cerebrospinalflüssigkeiten erwiesen sich bei der Prüfung auf einzelne Komplementbestandteile als praktisch komplementfrei. Von beiden Komponenten waren nur Spuren vorhanden. Eine Probe menschlicher Milch ergab ein negatives Resultat.

Dieses Überwiegen des Mittelstückes findet man nicht nur bei der Untersuchung mit dem verwendeten Immunamboceptor, sondern auch mit Normalamboceptoren der auf Mittelstück geprüften Sera. (Vgl. z. B. Versuch 14, Reihe III u. V.) Dies demonstriert der zu diesem Zweck angestellte Versuch 15 mit normalem Rinderserum, das einen relativ hohen Gehalt an Normalhämolysinen hat, recht deutlich. Durch Zusatz von Meerschweinchenendstück ist die Hämolyse für Kaninchen- und Meerschweinchenblut verstärkt worden, und für Ziegenblut ist das Vorhandensein von Amboceptor und Mittelstück erst zutage getreten.

Versuch 15.

(30. VI.)

Rinderserum vom 28. VI. im „Frigo“ aufbewahrt. Endstück von Meerschweinchen, 1,0 = 0,1 Serum.

Meerschweinchenblut 5%, 2mal gewaschen.

Kaninchenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

					Meerschweinchenblut	Kaninchenblut	Ziegenblut
1.	$1{,}0\,{}^{1}/_{10}$ Rinderser.	+ 0,0 Kslg.	+ 1,0 Blut	+ 1,0 Endstück	komplett	komplett	komplett
2.	0,5 „ „	+ 0,5 „	+ „	+ „	„	stark, Aggl.	„
3.	0,25 „ „	+ 0,75 „	+ „	+ „	Spur	Zone, „	stark
4.	0,1 „ „	+ 0,9 „	+ „	+ „	gelblich	„ „	Spürchen
5.	0,05 „ „	+ 0,95 „	+ „	+ „	„	„ „	Zone
6.	$1{,}0\,{}^{1}/_{10}$ „	+ 1,0 „	+ „	+ 0	komplett	stark, „	0
7.	0,5 „ „	+ 1,5 „	+ „	+ 0	Spur	gelblich, Aggl.	0
8.	0,25 „ „	+ 1,75 „	+ „	+ 0	gelblich	„ „	0
9.	0,1 „ „	+ 1,9 „	+ „	+ 0	„	„ „	0
10.	0,05 „ „	+ 1,95 „	+ „	+ 0	„	„ „	0
11.	—	2,0	+ „	+ 0	gelblich	∅	0
12.	—	0	+ „	+ 2,0 Endstück	„	gelblich, Aggl.	gelblich
13.	—	1,0	+ „	+ 1,0 „	„	0	„

Durch unsere Untersuchungen über die quantitativen Mengenverhältnisse der beiden Komplementteile in verschiedenen Seris hat die oben gemachte Voraussetzung, daß das Endstück und Mittelstück auch im nativen Serum getrennt vorkommen, eine Stütze erhalten.

Es erschien uns daher notwendig, die Funktionen der beiden Komplementbestandteile bei der Hämolyse einer genauen

Analyse zu unterziehen, und wir haben zunächst Bindungsversuche angestellt, über die nun berichtet werden soll.

II.

Brand war der erste, der mit dem durch Dialyse gewonnenen Mittelstück und Endstück den grundlegenden Ehrlich-Morgenrothschen Bindungsversuch ausführte. Die Ergebnisse seiner wichtigen Untersuchungen führten ihn zu der Annahme, daß das Mittelstück die haptophore, das Endstück die zymophore Gruppe des einheitlichen Komplementes darstellt. Aus seinen Versuchen ging aber — streng genommen — nur hervor, daß sensibilisierte Blutkörperchen in einer Mittelstücklösung derart verändert werden, daß sie vom Endstück allein aufgelöst werden. Brand hat nämlich die quantitative Untersuchung der Mittelstücklösung nach der Digestion mit sensibilisiertem Blut nicht durchgeführt, und sein Schluß war daher nicht ganz berechtigt.

Um über diese Frage Klarheit zu erlangen, haben wir entsprechende Versuche angestellt.

Einige unserer diesbezüglichen Protokolle folgen:

Versuch 16.

(28. VII.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Mittelstück und Endstück gespalten. Das Mittelstück wurde in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Versuchsanordnung entspricht der von Brand angewandten (Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 34, S. 7).

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII., 1fach lös. Dos. 0,5 $^1/_{1000}$.

1. 100,0 Ziegenblut 5% + 0,5 Amboc. (= 10fach lös. Dos.)
2. 100,0 „ + 0,5 Kochsalzlösung

1 Stunde bei 37°.

Abzentrifugiert und mit Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

1.	1,0 sens. Blut	+ 1,0 Mittelstück	(= 0,16 Serum)	+ 0,0 Kalg.
2.	„	+ 0,5 „	(= 0,08 „)	+ 0,5 „
3.	„	+ 0,25 „	(= 0,04 „)	+ 0,75 „
4.	„	+ 0,15 „	(= 0,024 „)	+ 0,85 „
5.	„	+ 0,1 „	(= 0,016 „)	+ 0,9 „
6.	„	+ 0,05 „	(= 0,008 „)	+ 0,95 „
7.	„	+	—	+ 1,0 „
8.	„	+	—	+ 1,0 „

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°. Nachher wurden sie zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit sorgfältig (mit Filtrierpapier) entfernt und die Bodensätze 1, 2, 3, 6, 7, 8, in entsprechenden Mengen von Kochsalzlösung und Endstück aufgeschwemmt. Bodensatz 4 und 5 wurden wegen Verwechslung ausgeschaltet.

Untersuchung der Bodensätze:

1.	Bodensatz 1 + 2,0	Endstück + 1,0	Kslg.		wenig
2.	„ 2 + 1,0	„ + 2,0	„		Spur
3.	„ 3 + 0,5	„ + 2,5	„		gelb
6.	„ 6 + 0,1	„ + 2,9	„		0
7.	„ 7 + 2,0	„ + 1,0	„		sehr schwach gelblich
8.	„ 8 +	— + 2,9	„	+ 0,1 Kompl.	komplett

Untersuchung der Abgüsse:

1.	Abguß 1 + 1,0 sens. Blut	+ 0,0 Kslg.	+ 1,0 Endstück[1])		komplett
2.	„ 2 + „	+ 0,0 „	+ 1,0 „		„
3.	„ 3 + „	+ 0,5 „	+ 0,5 „		„
4.	„ 4 + „	+ 0,7 „	+ 0,3 „		fast komplett
5.	„ 5 + „	+ 0,8 „	+ 0,2 „		mäßig
6.	„ 6 + „	+ 0,9 „	+ 0,1 „		Spürchen
7.	„ 7 + „	+ 0 „	+ 1,0 „		gelb
8.	„ 8 + „	+ 0,9 „	+ 0,1	Kompl.	komplett

Endstück und Mittelstück mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft: keine Hämolyse.

In entsprechenden Mengen zusammen sind sie gut wirksam:

1. 0,5 Endstück + 0,3 Mittelstück (= 0,5 $^1/_{10}$ Serum) komplett
2. 0,3 „ + 0,18 „ (= 0,3 $^1/_{10}$ „) fast komplett

Resultat: Von dem dargebotenen Mittelstück sind von den Blutkörperchen nur minimale Mengen gebunden worden. Die Mittelstücklösung ist ungeschwächt geblieben.

Versuch 17.

(29. VII.)

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor vom 14. VII. 1fach lös. Dos. 0,5 $^1/_{1000}$.

100,0 ccm Ziegenblut 5% + 0,5 ccm Amboceptor (10fach lös. Dos.) 1 Stunde bei 37°.

Das durch Zentrifugieren erhaltene Sediment wurde mit so viel Kochsalzlösung versetzt, daß die Blutaufschwemmung 5%ig war.

---

[1]) Das Endstück wurde überall 1 Stunde nach dem Mittelstück zugesetzt.

1. 1,0 sens. Blut + 1,0 Mittelstück (= 0,16 Serum) + 0,0 Kslg.
2. „ + 0,5 „ (= 0,08 „) + 0,5 „
3. „ + 0,25 „ (= 0,040 „) + 0,75 „
4. „ + 0,1 „ (= 0,016 „) + 0,9 „
5. „ + — + 1,0 „
6. „ + — + 1,0 „

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°.

Nachher wurden sie zentrifugiert und die Bodensätze 2mal mit je 4,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen. Nun erst in entsprechender Menge von Endstück und Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

1. Bodensatz 1. + 1,0 Kslg. + 2,0 Endstück wenig
2. „ 2. + 2,0 „ + 1,0 „ „
3. „ 3. + 2,5 „ + 0,5 „ Spürchen
4. „ 4. + 2,8 „ + 0,2 „ gelblich
5. „ 5. + 1,0 „ + 2,0 „ „
6. „ 6. + 2,9 „ + 0,1 Komplement kompl.

Untersuchung der Abgüsse:
(Das Endstück wurde 1 Stunde nach dem Abguß zugesetzt.)

1. Abguß 1. + 1,0 sens. Blut + 0,0 Kslg. + 1,0 Endstück
2. „ 2. + „ + 0,0 „ + 1,0 „
3. „ 3. + „ + 0,5 „ + 0,5 „
4. „ 4. + „ + 0,8 „ + 0,25 „
5. „ 5. + „ + — „ + 1,0 „
6. „ 6. + „ + 0,9 „ + 0,1 Komplement

Resultat:
1. komplett
2. „
3. fast komplett
4. gelb
5. gelblich
6. komplett

Endstück und Mittelstück allein mit und ohne Amboceptor auf Hämolyse geprüft: ∅.

Endstück mit Mittelstück zusammen gut wirksam:
0,5 Endstück + 0,3 Mittelstück (= $0,5^1/_{10}$ Kompl.) = komplett.

Resultat: Wie Vers. 16.

Versuch 18.
(30. VII.)

5 ccm frischen Meerschweinchenserums in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 30,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5%, 2mal gewaschen.

Ziegen-Kaninchen-Amboceptor v. 13. VII. 1fach lös. Dos. = $0,5^1/_{1000}$.

100,0 Blut + 2,5 ccm Amboceptor = 50fach lös. Dos. 1 Stunde bei 37°, abzentrifugiert und wieder zu 55% Blut aufgeschwemmt.

1.	1,0 sens. Blut	+ 1,0 Mittelstück	(= 0,16 Ser.)	+ 0,0 Kslg.
2.	„	+ 0,5 „	(= 0,08 „)	+ 0,5 „
3.	„	+ 0,25 „	(= 0,04 „)	+ 0,75 „
4.	„	+ 0,15 „	(= 0,024 „)	+ 0,85 „
5.	„	+ 0,1 „	(= 0,016 „)	+ 0,9 „
6.	„	+ 0,5 „	(= 0,008 „)	+ 0,95 „
7.	„	+ — „		+ 1,0 „
8.	„	+ — „		+ 1,0 „

Die Röhrchen blieben 1 Stunde bei 37°.

1. bis 3. weisen sehr starke Agglutination auf, die anderen schwächere. Nach dem Abzentrifugieren werden die Bodensätze 2mal mit je 5,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen und nachher in entsprechender Endstück- und Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Beim Waschen tritt eine schwache Hämolyse auf, weshalb die Blutkörperchenaufschwemmung blaß und dünn ist. (Agglutinierte Blutkörperchen.)

Untersuchung der Bodensätze:

1.	Bodensatz	1. + 2,0 Endstück	+ 1,0 Kslg.	komplett
2.	„	2. + 1,0 „	+ 2,0 „	fast „
3.	„	3. + 0,5 „	+ 2,5 „	stark
4.	„	4. + 0,3 „	+ 2,7 „	Spur
5.	„	5. + 0,2 „	+ 2,8 „	0
6.	„	6. + 0,1 „	+ 2,9 „	0
7.	„	7. + 2,0 „	+ 1,0 „	0
8.	„	8. + — „	+ 2,9 „ + 0,1 Kompl.	kompl.

Untersuchung der Abgüsse auf freies Mittelstück.

Die Abgüsse der Röhrchen 1 bis 3 waren stark hämoglobinhaltig (entsprechend etwa einer mäßigen Hämolyse), Abgüsse 4 und 5 weniger.

1.	Abguß	1. + 1,0 sens. Blut	+ 1,0 Endstück	+ 0,0 Kslg.	kompl.
2.	„	2. + „	+ 1,0 „	+ 0,0 „	„
3.	„	3. + „	+ 0,5 „	+ 0,5 „	„
4.	„	4. + „	+ 0,3 „	+ 0,7 „	stark
5.	„	5. + „	+ 0,2 „	+ 0,8 „	wenig
6.	„	6. + „	+ 0,1 „	+ 0,9 „	Spur
7.	„	7. + „	+ 1,0 „	+ 0 „	„
8.	„	8. + „	+ — „	+ 0,9 „ + 0,1 Kompl.	kompl.

Endstück und Mittelstück allein: ∅.

Endstück mit dem Mittelstück als Komplement gut wirksam:

0,2 Endstück + 0,12 Mittelstück (= 0,2 $^1/_{10}$ Kompl.) komplett (Schleier)

Resultat: Die mit 50 lösenden Amboceptordosen sensibilisierten Blutkörperchen binden das Mittelstück.

Versuch 19.

5,0 ccm frischen Meerschweinchenserums wurden mit Kohlensäure in angegebener Weise in Mittelstück und Endstück gespalten.

Mittelstück wurde in 10,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und ein Teil sofort auf Hämolyse untersucht. Da es stark allein löste, so blieb der Rest $1^1/_2$ Stunden bei 37° (= Heckersche Modifikation, die keine Hämolyse ohne Endstück zeigt).

Hammelblut-Kaninchen-Amboceptor vom 18. VI. 1 mal lös. Dos. für Ziegenblut 0,001 ccm. Ziegenblut 5%, 2 mal gewaschen.

100,0 ccm Ziegenblut 5% + 2,5 ccm Amboc. (25 mal lös. Dos.),
100,0 „ „ + 2,5 „ physiol. Kochsalzlösung,

$1^1/_2$ Stunden bei 37°. (Keine Agglutination.)

Die Blutkörperchen wurden abzentrifugiert und zu 5% in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Bindungsversuch.

1.	4,0 sens. Blut	+ 1,6 Mittelst. „Hecker“	(= 0,8 Meerschw.-Ser.)	+ 0,4	Kslg.
2.	„	+ 0,8 „	(= 0,4 „)	+ 1,2	„
3.	„	+ 0,4 „	(= 0,2 „)	+ 1,6	„
4.	„	+ 0,24 „	(= 0,12 „)	+ 1,76	„
5.	„	+ 0,16 „	(= 0,08 „)	+ 1,84	„
6.	„	+ 0,08 „	(= 0,04 „)	+ 1,2	„
7.	„	+	—	+ 2,0	„
8.	4,0 nicht sens. Blut	+	—	+ 2,0	„

Die Röhrchen blieben 2 Stunden bei 37°. Nirgends Hämolyse. Durch Zentrifugieren wurden die Blutkörperchen von der Flüssigkeit getrennt:

Bodensätze = B_1, B_2 usw.

Abgüsse = A_1, A_2 usw. (A_7 und A_8 wurden nicht untersucht.)

Untersuchung der Bodensätze:

Diese wurden zunächst mit je 5,0 ccm Kochsalzlösung gewaschen und dann in je 4,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Nachher wurde die der Menge des Mittelstückes entsprechende Quantität Endstück zugesetzt.

B_1

1. 1,0 ccm B_1-Aufschwemmung + 2,0 Endstück + 0,5 Kslg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Hämolyse nach 2 Stunden bei 37°.

1. kompl. Lös.
2. ∅
3. kompl. Lös.

B_2

1. 0,1 ccm B_2-Aufschwemmung + 1,0 Endstück + 1,5 Kslg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. sehr stark
2. 0
3. kompl. Lös.

B_3

1. 1,0 ccm B_3-Aufschwemmung + 0,5 Endstück + 2,0 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. Spur
2. 0
3. kompl. Lös.

B_4

1. 1,0 ccm B_4-Aufschwemmung + 0,3 Endstück + 2,2 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. sehr schwach gelblich
2. 0
3. kompl. Lös.

B_5

1. 1,0 ccm B_5-Aufschwemmung + 0,2 Endstück + 2,3 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. sehr schwach gelblich
2. 0
3. kompl. Lös.

B_6

1. 1,0 ccm B_6-Aufschwemmung + 0,1 Endstück + 2,4 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. 0
2. 0
3. kompl. Lös.

B_7

1. 1,0 ccm B_7-Aufschwemmung + 2,0 Endstück + 0,5 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. gelblich
2. 0
3. kompl. Lös.

B_8

1. 1,0 ccm B_8-Aufschwemmung + 2,0 Endstück + 0,5 Kalg.
2. „ + — + 2,5 „
3. „ + 0,1 Meerschw.-Serum + 2,4 „

Resultat:

1. 0
2. 0
3. gelblich

Untersuchung der Abgüsse (A_1 bis A_6).

Versuchsanordnung: Je 1,5 ccm der Abgüsse wurden mit 1,0 sensibilisierten Blutes und Kochsalzlösung 1 Stunde bei 37° digeriert und nachher die entsprechende Quantität Endstück zugesetzt.

1.	1,5 ccm von	A_1	enthält	0,4 Mittelstück	(= 0,2 Meerschw.-Ser.)
2.	„	A_2	„	0,2 „	(= 0,1 „)
3.	„	A_3	„	0,1 „	(= 0,05 „)
4.	„	A_4	„	0,06 „	(= 0,03 „)
5.	„	A_5	„	0,04 „	(= 0,02 „)
6.	„	A_6	„	0,02 „	(= 0,01 „)

Versuch:

1.	1,5 ccm A_1 +	1,0 sens. Blut	+ — Kalg.	1 Std. bei 37°	+ 1,0 Endstück
2.	„ A_2 +	„	+ — „		+ 1,0 „
3.	„ A_3 +	„	+ 0,5 „		+ 0,5 „
4.	„ A_4 +	„	+ 0,7 „		+ 0,3 „
5.	„ A_5 +	„	+ 0,8 „		+ 0,2 „
6.	„ A_6 +	„	+ 0,9 „		+ 0,1 „

Resultat:

1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. mäßig
5. gelblich
6. sehr schwach gelblich

Kontrollen:

Endstück auf Hämolyse geprüft:

1. 2,0 Endstück	+ 1,0 sens. Blut	Spur
2. 1,0 „	+ „	gelb
3. 2,0 „	+ 1,0 nicht sens. Blut	0
4. 1,0 „	+ „	0

Mittelstück („Hecker") auf Hämolyse geprüft:

1. 0,8 Mittelstück	+ 1,0 sens. Blut	+ 1,7 Kalg.	0
2. 0,4 „	+ „	+ 2,1 „	0
3. 0,2 „	+ „	+ 2,3 „	0
4. 0,8 „	+ 1,0 nicht sens. Blut	+ 1,7 „	0
5. 0,4 „	+ „	+ 2,1 „	0
6. 0,2 „	+ „	+ 2,3 „	0

Komplementtitration:

1	1,0 ccm Kompl. 1/10	+ 1,0 sens. Blut	+ 1,5 Kalg.	kompl. Lös.
2.	0,5 „	+ „	+ 2,0 „	„ „
3.	0,3 „	+ „	+ 2,2 „	„ „
4.	0,2 „	+ „	+ 2,3 „	„ „
5.	0,1 „	+ „	+ 2,4 „	mäßig
6.	1,0 „	+ 1,0 nicht sens. Blut	+ 1,5 „	0
7.	—	+ 1,0 sens. Blut	+ 2,5 „	0
8.	—	+ 1,0 nicht sens. Blut	+ 2,5 „	0

Mittelstück und Endstück in Mengen, die denjenigen bei der Komplementtitration entsprechen. Endstück wurde 1 Stunde nach Mittelstück zugesetzt.

1. 0,2 Mittelstück	+ 1,0 sens. Blut	+ 1,3 Kslg.	1 Std. bei 37°	+ 1,0 Endstück
2. 0,1 „	+ „	+ 1,9 „		+ 0,5 „
3. $0{,}6^{1}/_{10}$ „	+ „	+ 1,6 „		+ 0,3 „
4. $0{,}4^{1}/_{10}$ „	+ „	+ 1,9 „		+ 0,2 „
5. $0{,}2^{1}/_{10}$ „	+ „	+ 2,2 „		+ 0,1 „

6. wie 1. mit nicht sens. Blut
7. „ 2. „ „ „ „
8. „ 3. „ „ „ „

Resultat:
1. kompl. Lös.
2. „ „
3. fast kompl. Lös.
4. mäßig
5. gelblich

6. 0
7. 0
8. 0

Fassen wir die Resultate unserer Experimente zusammen, so ergibt sich, daß bei 10fach sensibilisiertem Blute in physiologischer Salzlösung nur eine minimale Bindung von Mittelstück nachweisbar war, da die Blutkörperchen durch Endstück allein entweder gar nicht oder nur sehr wenig aufgelöst wurden und die Mittelstücklösung quantitativ wirksam geblieben ist.

Erst bei 25 bis 40 lösenden Amboceptordosen wurde stets Mittelstück gebunden, da das Blut durch entsprechende Endstückmengen aufgelöst wurde und die Mittelstücklösung einen, wenn auch geringen, Defekt aufwies.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit denjenigen von Liefmann und Cohn, die nach Beendigung unserer Versuche veröffentlicht worden sind, und haben ihre Analogien in den Untersuchungen über persensibilisierte Blutkörperchen von Michaelis und Skwirsky[1]) und in den Arbeiten über die Kältetrennung innerhalb des Komplementes von Sachs und Bolkowska.[2])

[1]) Michaelis und Skwirsky, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 4, 1909.
[2]) Sachs und Bolkowska, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 7, 1910.

Michaelis und Skwirsky stellten nämlich fest, daß bei 40 Amboceptoreinheiten eine Trennung innerhalb des nativen Komplementes bei saurer Reaktion und Bruttemperatur erfolgt, und Sachs und Bolkowska zeigten, daß bei 0° und höherem Amboceptorgehalt das gleiche zu erzielen ist, während bei geringer Immunkörpermenge die Trennung ausbleibt. Guggenheimer hat festgestellt, daß im salzfreien Medium die Trennung gleichfalls nur unter diesen Bedingungen erfolgen kann.

Diese Tatsachen sind also mit den Resultaten unserer Versuche und derjenigen von Liefmann und Cohn im Einklang. Wir wollen uns mit der Mitteilung dieser Ergebnisse begnügen, ohne auf die Analyse dieser interessanten Erscheinung näher einzugehen, da dieselbe bereits von Liefmann und Cohn in erschöpfender Weise durchgeführt worden ist. So viel muß nur hervorgehoben werden, daß die Ergebnisse dieser Experimente mit den herrschenden Anschauungen über den Mechanismus der Komplementwirkung in einem gewissen Widerspruche stehen. Der Ablauf der Vorgänge bei der Auflösung der roten Blutkörperchen scheint ein komplizierterer zu sein, als die Ehrlich-Morgenrothsche Theorie annahm.

III.

Die von Flexner und Noguchi[1]), Noc[2]) sowie Morgenroth und Kaya[3]) studierte komplementzerstörende Fähigkeit des Kobragiftes schien uns dazu geeignet zu sein, über die Natur der beiden Komplementbestandteile etwas zu erfahren.

Nachdem im Kobragifte eine „Lecithinase" nachgewiesen wurde, lag doch der Gedanke nahe, dieses Ferment auch für die Komplementzerstörung verantwortlich zu machen, wobei die seit langem vermutete „Lipoid"natur des Komplements in anderem Gewande wiederum auftauchen würde.

Von unseren Versuchen, die alle das gleiche Resultat zeigten, möge einer folgen:

---

[1]) Flexner und Noguchi, The Journ. of exper. Med. 6, 1903.

[2]) Noc, Annales de l'Inst. Pasteur 19, 1905.

[3]) Morgenroth und Kaya, diese Zeitschr. 8, Heft 2 bis 4.

Versuch 20.

(21. VII.)

Kobragiftlösung 1 % (in physiologischer Kochsalzlösung + Glycerin āā). Frisches Meerschweinchenserum.

10,0 ccm frischen Meerschweinchenserums mittels CO_2 in Endstück und Mittelstück gespalten. Dieses in 20,0 ccm Kochsalzlösung gelöst.

Ziegenblut 5 %, 2 mal gewaschen.

I. Blut sofort zugesetzt.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+ Kslg.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+ 0,8	+ 1,0	kompl. Lös.
2.	„	+	1,0 1/10	+ —	+ „	„ „
3.	„	+	0,5 „	+ 0,5	+ „	wenig
4.	„	+	0,25 „	+ 0,75	+ „	Spur
5.	„	+	0,1 „	+ 0,9	+ „	gelblich
6.	„	+	0,05 „	+ 0,95	+ „	„

II. Blut erst zugesetzt, nachdem die Kobragift-Meerschweinchenserum-Mischungen 3 Stunden bei 37° verweilt hatten.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+ Kslg.		+ Kslg.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+ 0,8	3 Std. bei 37°	1,0	+ 1,0	gelblich
2.	„	+	1,0 1/10	+ —		„	+ „	gelb
3.	„	+	0,5 „	+ 0,5		„	+ „	wenig
4.	„	+	0,25 „	+ 0,75		„	+ „	„
5.	„	+	0,1 „	+ 0,9		„	+ „	gelb
6.	„	+	0,05 „	+ 0,95		„	+ „	gelblich

III. Versuchsreihe wie II mit nachträglichem Zusatz von Endstück und Blut.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+ Kslg.		+ Endst.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+ 0,8	3 Std. bei 37°	1,0	+ 1,0	Spürch.
2.	„	+	1,0 1/10	+ —		„	+ „	Spur
3.	„	+	0,5 „	+ 0,5		„	+ „	sehr stark
4.	„	+	0,25 „	+ 0,75		„	+ „	do.
5.	„	+	0,1 „	+ 0,9		„	+ „	mäßig
6.	„	+	0,05 „	+ 0,95		„	+ „	wenig

IV. Versuchsreihe wie II mit nachträglichem Zusatz von Mittelstück und Blut.

	Kobragift	+	Meerschweinchenser.	+ Kslg.		+ Mittelst.	+ Kslg.	+ Blut	
1.	0,5 1/10	+	0,2	+ 0,8	3 Std. bei 37°	0,4	+ 0,6	+ 1,0	kompl. Lös.
2.	„	+	1,0 1/10	+ —		„	+ „	+ „	„
3.	„	+	0,5 „	+ 0,5		„	+ „	+ „	fast „
4.	„	+	0,25 „	+ 0,75		„	+ „	+ „	stark
5.	„	+	0,1 „	+ 0,9		„	+ „	+ „	Kuppe
6.	„	+	0,05 „	+ 0,95		„	+ „	+ „	„

Kontrollen:

1.	Blut + Kalg.	0
2.	2,0 Endstück + Blut	gelblich
3.	1,0 „ + „	„
4.	0,8 Mittelstück + Blut	0
5.	0,4 „ + „	0
6.	1,0 $^1/_{10}$ Kobragift + Blut	0
7.	0,5 „ „ + „	0
8.	0,2 Meerschweinchenserum + Blut	gelblich
9.	1,0 Endstück + 0,4 Mittelst. + Blut	wenig

Überblicken wir das Experiment, so sehen wir, daß durch das Kobragift nur das Mittelstück zerstört wird. Das Endstück bleibt intakt.

Gleichzeitig geht aber im Meerschweinchenserum eine andere Veränderung vor sich, und zwar derart, daß durch die Einwirkung des Kobragiftes ein Hämolysin entsteht, dessen Wirkung durch Endstück verstärkt wird. Die Annahme liegt nahe, die Spaltung des Lecithins dafür verantwortlich zu machen und die Verstärkung durch Endstück als „Beschleunigungsphänomen" aufzufassen, wie wir es durch die Untersuchungen von v. Liebermann[1]), Dungern und Coca[2]), F. Sachs[3]) u. a. kennen gelernt haben.

Auffällig ist, daß die Bildung des Hämolysins unter der Einwirkung des Kobragiftes nur bei bestimmter Konzentration des Meerschweinchenserums nachweisbar ist.

Weiteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, die hierbei bestehenden Verhältnisse aufzuklären.

Doch liegt es jedenfalls nahe, das Mittelstück mit Lipoiden in irgend eine Beziehung zu bringen.

Die isolierte Mittelstückzerstörung durch das Kobragift bildet außerdem eine neue Stütze für die Behauptung, daß die beiden Komplementbestandteile im nativen Serum getrennt vorkommen, da sonst diese Tatsache ohne die letztere Annahme nicht leicht verständlich wäre.

Zusammenfassung.

1. Der Gehalt der Normalsera (Ziege, Hammel, Rind, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Mensch) an den beiden Komple-

---

[1]) v. Liebermann, Arch. f. Hygiene 62, 1907; diese Zeitschr. 4, 1907.

[2]) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1908.

[3]) F. Sachs, diese Zeitschr. 12, 1908.

mentbestandteilen ist ein verschiedener. Endstück fehlt in manchen, doch Mittelstück ist stets nachweisbar und fehlt in keinem der untersuchten Sera. Die bis jetzt geübte Methode der Komplementbestimmung mißt nur den Gehalt an Endstück, nicht dagegen den an Mittelstück. Die beiden Komplementbestandteile sind im nativen Serum getrennt nebeneinander vorhanden.

2. Im Meerschweinchenserum befinden sich Endstück und Mittelstück in ungefähr äquivalenten Mengen. Sie können sich auch bis zu einem gewissen Grade bei der Hämolyse funktionell vertreten, insbesondere kann Endstück das Mittelstück ersetzen.

3. Das Mittelstück des Kaninchen-, Rinder-, Hunde-, Menschen-, Ziegen- und Hammelserums ist durch Meerschweinchenendstück ergänzbar und zeigt sich nicht nur mit einem Immunamboceptor, sondern auch mit Normalamboceptoren wirksam.

4. Das isolierte Meerschweinchenmittelstück wird von unter 10 Amboceptoreinheiten sensibilisierten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung wenig oder gar nicht gebunden (Liefmann und Cohn). Erst bei 25 bis 40 Amboceptoreinheiten ist eine erheblichere Bindung nachweisbar.

5. Das Kobragift zerstört nur das Mittelstück des nativen Serums, das Endstück läßt es intakt. Gleichzeitig entsteht im Meerschweinchenserum ein Hämolysin.

Über die Hemmung der Suprareninglucosurie und der sekretorischen Nierenleistung durch peritoneale Reize.

Von

Otto von Fürth und Carl Schwarz (Wien).

(Ausgeführt mit Unterstützung des Elizabeth-Thompson-Science-Fund, Boston.)

(*Eingegangen am 14. Januar 1911.*)

I. Einleitung.

Seitdem Blum im Jahre 1901 die wichtige Beobachtung gemacht hatte, daß die Injektion von Nebennierenpräparaten imstande ist, glucosurisch zu wirken, hat diese Erscheinung immer und immer wieder das Interesse zahlreicher Forscher in Anspruch genommen. In den letzten Jahren ist insbesondere die Frage in den Vordergrund gerückt, ob man berechtigt sei, in der Adrenalinglucosurie eine Äußerung der normalen physiologischen Wirkung des „inneren Sekretes" der Nebenniere zu erblicken. Andererseits ist aber, angesichts der dominierenden Stellung, die die Bauchspeicheldrüse seit der Entdeckung des Pankreasdiabetes in der Lehre vom Kohlenhydratstoffwechsel einnimmt, leicht verständlich, daß man sich bemühte, über etwaige Beziehungen der innersekretorischen Tätigkeit des Pankreas und der Nebenniere Aufklärung zu erlangen.[1])

Die letztgenannten Bemühungen schienen zu einem greifbaren Resultate geführt zu haben, als Zuelzer[2]) zeigen konnte,

[1]) Vgl. die neue Zusammenstellung der einschlägigen Literatur von G. Bayer in Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse der pathologischen Anatomie 14, 100 ff., 1910.

[2]) G. Zuelzer, Verhandl. d. Kongr. f. innere Med. 1907, 258. — Experimentelle Untersuchungen über den Diabetes. Berl. klin. Wochenschr. 1907, 474.

daß einerseits bei pankreaslosen Tieren die Glucosurie ausbleibt, wenn man die Nebennierenvenen unterbunden hat und daß andererseits Injektionen von Pankreasextrakten die Adrenalinglucosurie hindern.

„Während das Adrenalin", sagt Zuelzer, „eine Zuckerausscheidung der Leber bedingt, ist der Pankreassaft, das Pankreasferment, dazu da, diese „Nebennierenferment"wirkung zu neutralisieren. War diese Annahme richtig, so mußte, wenn ich gleichzeitig einem gesunden Kaninchen Nebennierensaft oder Adrenalin in einer die Glucosurie hervorrufenden Menge und andererseits Pankreasextrakt oder ein Pankreaspräparat, das ich durch Entfernung der Eiweißkörper entgiftet hatte, injizierte, die Zuckerausscheidung notwendigerweise fortfallen... Diese Versuche habe ich ungezählte Male gemacht. Es gelang mir dauernd, mit einer bestimmten Menge Pankreasextrakt oder Pankreaspräparat den Nebennierendiabetes mit Sicherheit zu unterdrücken."

Die Beobachtungen von Zuelzer sind von vielen Seiten her bestätigt worden, so zuerst (allerdings mit wechselndem Erfolge) von Biedl und Offer[1]), sodann von Frugoni[2]), Makaroff[3]), von Gautrelet[4]) (der sie mit dem Cholingehalte des Pankreas in Zusammenhang bringen wollte) Forschbach[5]) und insbesondere auch von Gläßner und Pick[6]). An der Erscheinung als solcher ist also sicherlich nicht zu zweifeln.

---

[1]) Biedl und Offer, Über die Beziehungen der Ductualymphe zum Zuckerhaushalte. Hemmung der Adrenalinwirkung durch Lymphe. Wiener klin. Wochenschr. 1907, 1530.

[2]) C. Frugoni, Adrenalinglucosurie und ihre Beeinflussung durch den Extrakt und den Saft des Pankreas. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 35, S. 1906; vgl. auch Arch. ital. de Biol. 4, 209, 1908.

[3]) Makaroff, La question du diabète produit par l'adrénaline. La Presse Médicale, 8. Juillet 1908, 434.

[4]) J. Gautrelet, Choline et Glucosurie adrénalique. Compt. rend. Soc. Biol. 65, 173, 1908. Ibid. 174.

[5]) J. Forschbach (Med. Univ.-Klinik, Breslau), Versuche zur Behandlung des Diabetes mellitus mit dem Zuelzerschen Pankreashormon. Deutsche med. Wochenschr. 35, 2053, 1909.

[6]) K. Gläßner und Pick, Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung von Pankreas und Nebennieren. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 6, 1909.

Die letztgenannten Autoren stellten auch fest, daß die Adrenalinglucosurie ebenso wie durch Pankreasextrakt auch durch Pankreassaft gehemmt werden könne, und zwar auch (durch örtliche von der Adrenalininjektion getrennte) subcutane Beibringung des letzteren.

Zuelzer[1]) bemühte sich nun weiterhin, aus Pankreas ein Präparat zu gewinnen, das eine therapeutische Anwendung beim menschlichen Diabetes gestatten könnte. Dieses Bemühen wurde durch die hochgradige Toxizität der Pankreaspräparate wesentlich erschwert. Immerhin glaubte Zuelzer ein „Pankreashormon" in Händen zu haben, das bei intravenöser (!) Einverleibung in einer Reihe von Diabetesfällen die Ausscheidung des Zuckers, resp. der Acetonkörper vorübergehend gänzlich zu unterdrücken vermochte, wobei jedoch nicht unerwähnt bleiben soll, daß die intravenöse Injektion, wie auch Forschbach[2]) bei Wiederholung der Zuelzerschen Versuche an Diabetikern gefunden hat, oft von Schüttelfrost, mehrtägigem Fieber und hochgradiger Prostration gefolgt war.

In Weiterverfolgung des Gedankenganges, demzufolge das innere Sekret des Pankreas eine Hemmungswirkung auf das innere Sekret der Nebenniere ausüben sollte, gelangte Zuelzer zu der Hypothese, daß der Pankreasdiabetes eigentlich nichts anderes sei als ein positiver Nebennierendiabetes, d. h. auf einer vermehrten Zuckermobilisierung durch die ungehemmte Wirkung des dem Blute in normaler Weise zuströmenden Adrenalins beruhe.

Auch Eppinger, Falta und Rudinger[3]) haben in ihren Untersuchungen über die Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion die Zuelzerschen Versuche als eine direkte Stütze ihrer Auffassung betreffend die wechselseitige physiologische Hemmungswirkung zwischen Pankreas und chromaffinem System

---

[1]) G. Zuelzer, M. Dohrn und A. Marxer, Neuere Untersuchungen über den experimentellen Diabetes. Deutsche med. Wochenschr. 1908, Nr. 32, S. 1380. — G. Zuelzer, Über Versuche einer spezifischen Fermenttherapie des Diabetes. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5, 306, 1908.

[2]) Forschbach, l. c.

[3]) Eppinger, Falta und Rudinger, Über die Wechselwirkung der Drüsen mit innerer Sekretion. Zeitschr. f. klin. Med. 66, 27 u. 28, 1908.

angesehen: „Die wichtigste Wirkung der Exstirpation des Pankreas ist die direkte, das heißt der Ausfall des die Zuckerverbrennung hauptsächlich herbeiführenden inneren Sekretes.... Indirekte Wirkungen erfolgen nun ... durch den Wegfall der intensiveren Hemmung auf das chromaffine System. Dadurch Überfunktion des chromaffinem Systems mit konsekutiver, übermäßiger und überstürzter Mobilisierung der Kohlenhydrate.... Zuelzer hat gezeigt, daß nach Injektion einer entsprechenden Menge Pankreasextrakt Adrenalin bei Kaninchen nicht mehr glucosurisch wirkt. Zuelzer deutet dies so, daß durch das Pankreassekret das Adrenalin im Körper entgiftet wird. Unseres Erachtens ist diese Entgiftungstheorie nicht notwendig. Die Tatsache erklärt sich ungezwungen aus unserem Schema: Der infolge der Überfunktion von chromaffinem System im Übermaß mobilisierte Zucker kann bei gleichzeitiger Überfunktion von Pankreas noch verbrannt werden. Bei entsprechender Dosierung halten sich Überfunktion von Pankreas und chromaffinem System das Gleichgewicht."

Unter der Voraussetzung, daß die Lymphe des Ductus thoracicus das für die normale Zuckerverbrennung erforderliche innere Pankreassekret enthalte, prüften ferner Biedl und Offer[1]) den Einfluß von Hundelymphe auf die Adrenalinglucosurie; sie fanden nach Anwendung entsprechend großer Dosen eine erhebliche Verminderung, unter Umständen auch eine völlige Aufhebung derselben.

Alle Schlußfolgerungen, die aus den vorerwähnten Untersuchungen gezogen worden sind, basieren auf der Annahme, daß die Aufhebung der Adrenalinglucosurie durch die Injektion von Pankreaspräparaten eine durchaus eigentümliche und spezifische Organwirkung sei, die mit der physiologischen Wirkung des „inneren Sekretes" der Bauchspeicheldrüse im innigsten Zusammenhange stehe.

Gewisse Zweifel in bezug auf diesen wichtigen Punkt, die auch das Studium der einschlägigen Originalarbeiten nicht zu zerstören vermochte, haben uns nun veranlaßt, diese Frage einer kritischen und experimentellen Prüfung zu unterziehen.

---

[1]) l. c. Vgl auch A. Biedl, Innere Sekretion. Wien 1910, S. 206.

Wir hatten gelegentlich einer früheren Arbeit [1]), die den Einfluß intraperitonealer Injektionen von Trypsin und Pankreasgewebe auf die Stickstoffausscheidung und den Eiweißzerfall zum Gegenstande hatte, in reichlichem Maße Gelegenheit, uns von der hochgradig toxischen Wirkung derartiger Injektionen zu überzeugen. Es drängte sich uns daher die Frage auf, ob nicht etwa ein heftiger peritonealer Reiz als solcher imstande sei, die Suprareninglucosurie zu hemmen.

Daß das Eintreten bzw. Ausbleiben der Suprareninglucosurie von den mannigfachsten Schädlichkeiten beeinflußt wird, geht aus zahlreichen Literaturangaben hervor. So vermochten Biedl und Offer [2]) durch Injektion von Hirudin und Krebsmuskelextrakt, Tomaczewski und Wilenko [3]) durch verschiedene Lymphagoga der ersten Ordnung, Gläßner und Pick [4]) durch Wittepepton, Aronsohn [5]) durch künstliches Fieber, Ellinger und Seelig [6]) durch Nierenschädigungen, Pollak [7]) durch Diuresenhemmung die Suprareninglucosurie zu unterdrücken.

Es sei vorausschickend bemerkt, daß unsere Versuche zu dem Resultate geführt haben, daß zum mindesten die Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Injektion von Pankreaspräparaten durch den gesetzten peritonealen Reiz eine vollkommen ausreichende Erklärung findet und zu ihrer Deutung keineswegs der Annahme eines geheimnisvollen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere bedarf.

---

[1]) O. v. Fürth und C. Schwarz, Über den Einfluß intraperitonealer Injektionen von Trypsin und Pankreasgewebe auf die Stickstoffausscheidung und den Eiweißzerfall. Diese Zeitschr. 20, 384, 1909.

[2]) l. c.

[3]) Tomaczewski und Wilenko, Beitrag zur Kenntnis der antagonistischen Wirkung des Adrenalins und der Lymphagoga. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 26, 1221.

[4]) Gläßner und Pick, l. c.

[5]) Aronsohn, Die Zuckerausscheidung nach Adrenalininjektionen und ihre Beeinflussung durch künstlich erzeugtes Fieber. Virchows Archiv 174, 383.

[6]) Ellinger und Seelig, Der Einfluß von Fieber, Infektion und Nierenschädigung auf die Suprareninglucosurie. Münch. med. Wochenschr. 1905, 499.

[7]) L. Pollak, Experimentelle Studien über den Adrenalindiabetes. Arch. f. experm. Pathol. u. Pharmakol. 61, 1909.

II. A. Wiederholung des Zuelzerschen Fundamentalversuches nach Vorbehandlung mit Trypsin.

Um die Toxizität großer Pankreasdosen nach Möglichkeit auszuschalten, gingen wir zunächst so vor, daß wir das Versuchstier einer immunisatorischen Vorbehandlung nach dem Vorgange von Achalme durch intraperitoneale Injektion steigender Trypsindosen unterwarfen. Bezüglich der Einzelheiten dieses Vorganges sowie der aseptischen Durchführung der Injektion von Pankreasgewebe sei auf unsere vorerwähnte Publikation[1]) verwiesen.

1. Versuch.

Hund von 7,700 kg. Gleichmäßig mit 250 g Fleisch und 40 g Reis täglich gefüttert. Erhält am 14. X. 7 mg Adrenalin subcutan, worauf er in normaler Weise mit Glucosurie reagiert (Harn enthält 1,3 °/₀ Zucker). Der Hund erhält nunmehr am 19. X. 0,5 g Trypsin, am 21. X. 1 g, am 23. X. 1½ g, am 28. X. 2 g, am 6. XI. 2 g, am 25. XI. und 22. XII. 2½ g Trypsin Grübler intraperitoneal, ferner am 18. II. 1909 5 g feinst zerkleinertes Rindspankreas, am 22. II. 10 g Pankreas, am 3. III. 20 g Pankreas intraperitoneal. Der in dieser Weise in ausgiebigster Weise immunisatorisch vorbehandelte Hund erhielt am 16. III. um ½3 Uhr nachmittags 10 g frisches Pankreas intraperitoneal und einige Stunden später, um 7 Uhr abends 7½ mg Suprarenin; der nunmehr ausgeschiedene Harn war zuckerfrei. Die Suprareninglucosurie war also prompt gehemmt worden.

Es wurde nunmehr aus 15 g feingehacktem Pankreas ein Extrakt durch Auskochen mit Alkohol hergestellt, der Alkohol eingedampft, der fettige Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und filtriert. Dieses Extrakt wurde zugleich mit 7½ g Suprarenin am 22. III. injiziert. Wie vorauszusehen, erwies sich der Kochextrakt ganz wirkungslos und reagierte der Hund mit der Ausscheidung eines sehr zuckerreichen Harnes (Tagesmenge 180 ccm mit einem Gehalte von 4 °/₀ Zucker = 7½ g Zucker).

2. Versuch.

Hund von 5700 g, täglich mit 250 g Fleisch unter Zulage von etwas Fett gefüttert. Wurde am 25. I. 1909 mit 0,5 g Trypsin, am 9. II. mit 1 g, am 27. III. mit 1½ g, am 10. IV. mit 2 g, am 26. IV. mit 2½ g Trypsin, am 13. V. mit 3 g Pankreas, am 21. VI. mit 10 g Pankreas vorbehandelt. Am 9. VII. reagierte er auf die Injektion von 3 mg Suprarenin mit reichlicher Zuckerausscheidung. Am 12. VII. erhielt er um 11ʰ vorm. 10 g Pankreas intraperitoneal, um 4ʰ nachm. 3 mg Suprarenin; der am nächsten Tage ausgeschiedene Harn war zuckerfrei. Also auch

[1]) l. c. Diese Zeitschr. 20, 386.

hier prompte Hemmungswirkung. 2 Tage darauf wurde wieder dieselbe Suprarenindosis, jedoch ohne Pankreasbeigabe injiziert. Nunmehr reichliche Zuckerausscheidung.

3. Versuch.

Hund, täglich mit 250 g Fleisch und 40 g Fett gefüttert. Vorbehandlung: 3. IV. $^1/_2$ g, 10. IV. 1 g, 26. IV. $1^1/_2$ g, 5. V. 2 g, 24. V. $2^1/_2$ g Trypsin, 27. VI. 5 g Pankreas intraperitoneal. Am 7. VII. (Hunger) 4^h nachm. 9 mg Suprarenin. Der am nächsten Tage gesammelte Harn enthält 28,6 g Zucker. Am 12. VII. Hunger; um 11^h vorm. 10 g Pankreas intraperitoneal; um 4^h nachm. 9 mg Suprarenin. Der am nächsten Tage gesammelte Harn war *zuckerfrei*. 2 Tage darauf erhielt der Hund, wiederum im Hungerzustande, abermals 9 mg Suprarenin, aber diesmal ohne Pankreas; er reagierte mit einer Ausscheidung von 18,2 g Zucker (Zuckerbestimmungen nach *Bertrand*).

Ein Parallelversuch wurde mit einem in ganz gleicher Weise vorbehandelten Hunde in der Art vorgenommen, daß derselbe im Hungerzustande statt Suprarenin *Phlorizin* erhielt. Er schied nun, nachdem er am 9. VII. um 4^h $^1/_2$ g Phlorizin subcutan erhalten hatte, im Laufe desselben und des nächsten Tages im ganzen 20 g Zucker mit dem Harne aus. Am 11. VII. war der Harn wieder zuckerfrei. Am 14. VII. ließen wir den Hund wieder hungern und gaben ihm um 11^h 10 g Pankreas intraperitoneal, um 4^h nachm. $^1/_2$ g Phlorizin subcutan. Wider Erwarten wurde die Phlorizinglucosurie durch das Pankreas nicht nur nicht aufgehoben, vielmehr gesteigert, derart, daß im ganzen etwa 50 g Zucker eliminiert wurden.

4. Versuch.

Hund, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig gefüttert. Reagiert am 24. X. 1909 auf subcutane Injektion von 5 mg Suprarenin mit der Ausscheidung von 3,4 g Zucker (545 Harn mit einem Gehalte von 1,62% Zucker). Er wird am 20. X. mit 0,8 g Trypsin, am 5. XI. mit $1^1/_2$ g Trypsin, am 19. XI. mit 2 g Trypsin, am 25. XI. mit 5 g Pankreas vorbehandelt. Am 3. XII. um 11^h vorm. erhält er 10 g Pankreas intraperitoneal und 6 Stunden später 5 mg Suprarenin sowie auch gleichzeitig 1 g Chloralhydrat injiziert. Der am nächsten Tage gesammelte Harn ist *zuckerfrei*.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich sonach, daß *es trotz ausgiebigster immunisatorischer Vorbehandlung mit Trypsin, bzw. Pankreas stets gelungen ist, die Suprareninglucosurie durch vorherige intraperitoneale Injektion von feinzerkleinertem Pankreasgewebe prompt zu hemmen.* Wir vermochten also den *Zuelzer*schen Fundamentalversuch als solchen vollkommen zu bestätigen. Dagegen fiel ein Versuch, die *Phlorizinglucosurie* durch Pankreasinjektion zu hemmen, negativ aus.

B. Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Terpentin- und Aleuronat-Injektionen.

Da die intraperitoneale Injektion von Pankreasgewebe, die in so prompter Weise eine Hemmung der Suprareninglucosurie herbeizuführen vermochte, vermöge der Wirkung des tryptischen Fermentes regelmäßig mit einer sehr heftigen peritonealen Reizung einhergeht und häufig Fettgewebsnekrose sowie ausgedehnte exsudative und adhäsive Entzündungen zur Folge hat, lag es nahe, zu versuchen, ob nicht etwa auch einfache peritoneale Reize anderer Art die Suprareninglucosurie in ähnlicher Weise zu beeinflussen vermögen. Als solche Reize wählten wir die Injektion von Terpentinöl sowie von Aleuronat-Suspensionen. Es gelang nun tatsächlich, wenn auch nicht immer, so doch in der Mehrzahl der Versuche einen positiven Effekt zu erzielen. Wir teilen eine Anzahl derartiger positiver Versuche im folgenden mit.

1. Versuch.

Hund, $7^1/_2$ kg, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig gefüttert. Reagiert am 19. X. 1909 auf Injektion von 4 mg synthet. Suprarenins mit einer Ausscheidung von 6,8 g Zucker (470 ccm Harn mit 1,45$^0/_0$ Zucker). Am 15. X. ist der Harn wieder zuckerfrei. Am 18. X. erhält das Tier eine Injektion von 10 g steriler Rindsleber, die in der gleichen Weise, wie wir es mit dem Pankreas zu tun pflegten, mit der sterilisierbaren Zerreibungsmaschine [Modell des hygienischen Institutes in Berlin[1])] auf das feinste zerkleinert worden war. Eine 2 Stunden später gemachte Suprarenininjektion war von einer Zuckerausscheidung von 1,76 g (220 ccm Harn mit 0,8$^0/_0$ Zucker) gefolgt. Die Injektion von Lebergewebe vermochte sonach die Suprareninglucosurie nicht zu verhindern.

Am 12. XI. erhielt der Hund 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 6 Stunden später 4 mg Suprarenin. Am nächsten Tage fanden sich 300 ccm zuckerfreien Harnes vor.

Am 16. XI. reagierte der Hund auf eine Injektion von 4 mg Suprarenin in normaler Weise mit einer Ausscheidung von 3,27 g Zucker (385 Harn mit 0,85$^0/_0$ Zucker).

2. Versuch.

Ein Rattler von $5^1/_2$ kg Gewicht wird mit 200 g Fleisch und 20 g Fett regelmäßig gefüttert. Sein Harn ist zuckerfrei. Er reagiert am 13. X. 1909 auf eine Injektion von 3 mg synthetischen Suprarenins in

---

[1]) Vgl. Katalog der Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Nr. 147.

normaler Weise mit einer Ausscheidung von 4,18 g Zucker (216 ccm Harn mit 1,9 % Zucker). Am 15. X. ist der Harn wieder zuckerfrei.

Am 18. X. werden 10 g steriler, feinst zerkleinerter Rindermilz ntraperitoneal injiziert und 2 Stunden später 3 mg Suprarenin. Die darauffolgende Zuckerausscheidung beträgt 3,05 g (250 ccm Harn mit 1,22 % Zucker).

Am 7. XII. um 9h früh wird 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal injiziert, um $3^1/_2{}^h$ $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Um 5h geben wir dem Hunde, um (aus später zu erörternden Gründen) eine ausgiebige Diurese zu erzielen, 1 g Diuretin mit 350 ccm Wasser per Schlundsonde; diesmal bleibt die Hemmung der Glucosurie aus: In dem in reichlicher Menge angesammelten Harne fand sich 2,1 g Zucker (605 ccm mit 0,35 % Zucker).

Am 9. XII. erhält der Hund neuerlich $3^1/_2$ mg Suprarenin und reagiert prompt mit der Ausscheidung von 3,78 g Zucker (310 ccm Harn mit 1,22 % Zucker. Die folgenden Tage ist der Harn wieder zuckerfrei.

Am 18. XII. erhält der Hund wieder 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 6 Stunden später $3^1/_2$ mg Suprarenin, diesmal ohne Zusatz eines Diureticums. Der an den beiden darauffolgenden Tagen gesammelte Harn ist zuckerfrei.

3. Versuch.

Ein Foxterrier von 4100 g Gewicht erhält am 20. XI. 1909 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal und 8 Stunden später 2 mg Suprarenin. Die normale Zuckerausscheidung bleibt aus. 8 Tage später wird der Hund tot aufgefunden.

4. Versuch.

Hund von $6^1/_2$ kg, mit 250 g Fleisch und 30 g Fett regelmäßig genährt, reagiert am 28. X. 1909 auf Injektion von 3 mg Suprarenin (subcutan) mit Ausscheidung von 5 g Zucker (500 ccm Harn mit 1 % Zucker).

Am 6. XI. werden ihm um 11h vorm. 20 ccm einer dünnen Aleuronat-Emulsion intraperitoneal injiziert, sodann um 9h abends 3 mg Suprarenin subcutan. Der in den folgenden Tagen gesammelte Harn ist zuckerfrei, und auch noch am 13. XI. vermag eine Injektion der gleichen Suprareninmenge keine Glucosurie auszulösen.

Dagegen hat am 30. XI. die Injektion von 3 mg Suprarenin die Ausscheidung von 5,86 g Zucker (335 ccm Harn mit 1,75 % Zucker) zur Folge.

5. Versuch.

Rattler von $5^1/_2$ kg. Am 20. XI. Injektion von 20 ccm einer dünnen Aleuronat-Emulsion intraperitoneal und 8 Stunden später $2^1/_2$ mg Suprarenin subcutan: keine Zuckerausscheidung. Auch eine am 22. XI. vorgenommene Wiederholung der Suprarenininjektion blieb ohne Effekt. Dagegen war eine solche am 30. XI. von einer Zuckerausscheidung von 1,34 g gefolgt.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht mit Sicherheit hervor, daß unter Umständen ein peritonealer Reizzustand, wie er durch die Injektion von Terpentinöl oder Aleuronat künstlich hervorgerufen werden kann, geeignet ist, eine Hemmung der Suprarenin-Glucosurie herbeizuführen, ähnlich derjenigen, wie sie nach intraperitonealer Injektion von Pankreas zur Beobachtung gelangt.

III. Über den Einfluß peritonealer Reize auf die Diurese und die Ausscheidung krystalloider Substanzen.

Als wir nach Feststellung der Tatsache, daß peritoneale Reize eine Hemmung der Adrenalinglucosurie herbeizuführen vermögen, nunmehr versuchten, uns über die Ursache dieser Erscheinung klar zu werden, wurde unsere Aufmerksamkeit durch eine wichtige, aus dem Wiener pharmakologischen Institute kürzlich hervorgegangene Untersuchung Leo Pollaks[1]) nach einer bestimmten Richtung hingelenkt. Der genannte Autor hat nämlich die Tatsache festgestellt, daß der Eintritt einer Suprarenin-Glucosurie im hohen Grade von der gleichzeitig bestehenden Diurese beeinflußt wird. Während ein Blutzuckerstand von mehr als 0,25% beim Kaninchen auch ohne gleichzeitige Diuresteigerung zu Glucosurie führt, kommt bei einem Blutzuckergehalte von 0,15 bis 0,25% eine Glucosurie nur dann zustande, wenn gleichzeitig kräftige Diurese besteht.

Es lag nun nahe, daran zu denken, daß die Hemmung der Suprareninglucosurie durch peritoneale Reize etwa mit einer durch die letzteren herbeigeführten Diuresenhemmung zusammenhängen könnte.

Über die Beeinflussung der Zirkulationsverhältnisse in der Niere durch Reizung zentripetaler Nerven liegen Beobachtungen von Roy und von Bradford vor,[2]) und zwar wurde eine Kontraktion der Niere durch Reizung des zentralen Ischiadicus- und Vagusstumpfes, in mäßigem Grade auch durch

---

[1]) Leo Pollak, Experimentelle Studien über Adrenalin-Diabetes (Aus dem pharmakologischen Institute in Wien). Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 149, 1909.

[2]) Vgl. R. Melzners Artikel über Nierenabsonderung in Nagels Handb. d. Physiol. 2, 282, 1907.

Reizung des zentralen Stumpfes eines Intercostalnerven ausgelöst.

Wir haben nun einige Versuche ausgeführt, um festzustellen, inwiefern die Nierenfunktion durch einen durch Injektion von Terpentinöl oder Pankreasgewebe hervorgerufenen peritonealen Reiz beeinflußt wird, und zwar haben wir uns nicht damit begnügt, die Harnmenge zu messen, sondern haben auch die Stickstoff- und Kochsalzausscheidung verfolgt. Wie sehr unsere Annahme, daß die Beobachtung der Harnmenge allein kein ausreichendes Urteil über eine sich etwa einstellende Alteration der Nierentätigkeit gestatten würde, berechtigt war, hat sich im Laufe unserer Untersuchungen gezeigt.

Der Tagesharn unserer Versuchshunde wurde in 3 gesonderten Anteilen (8^h früh bis 4^h nachm., 4^h nachm. bis 10 oder 12^h nachts, 10 oder 12^h nachts bis 8^h früh) den nach Falks Methode operierten weiblichen Hunden mit dem Katheter entnommen und analysiert. Es wurde nur einmal des Tages, und zwar um 10 bzw. 12^h abends gefüttert. Es brachte dies den Vorteil mit sich, daß, falls nach der intraperitonealen Injektion Würgbewegungen eintraten, der Magen bereits leer war und eine Verunreinigung des Harnes durch Mageninhalt demnach nicht zu befürchten war.

Der Harnstickstoff wurde nach Kjeldahl, die Chloridausscheidung nach Volhard nach Vorbehandlung des Harnes in der von Mering[1]) für Hundeharn angegebenen Weise (Erwärmen mit Zinkstaub unter Zusatz von Schwefelsäure am Wasserbade) vorgenommen.

1. Versuch.

Hündin, 7300 g schwer, wurde nur einmal täglich, und zwar um 12^h nachts mit 400 g rohen, gehackten Fleisches gefüttert. Erhielt am 27. V. um 8^h früh 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal, um $2^1/_2{}^h$ 4 mg Adrenalin subcutan. Es gelang in diesem Falle nicht, die Glucosurie hintanzuhalten.

Harnmenge:

Harn gesammelt am um	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
8^h früh		177	153	129	418 (8h früh–4h nachm.)
				Inj. von Terpentin	
4^h nachm.		136	149	87	
12^h nachts	62	48	40	92	
		331	342	308	

[1]) Mering, Zeitschr. f. physiol. Chemie 8, 232.

N-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
8^h früh		5,63	5,87	6,19	
				Inj. von Terpentin	11,70
4^h nachm.		5,46	5,48	2,45	
12^h nachts	1,63	1,48	1,92	2,49	
		12,57	13,27	11,13	

NaCl-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	24. V.	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.
8^h früh		0,1376	0,1224	0,0903	
				Inj. von Terpentin	0,3026
4^h nachm.		0,3296	0,2011	0,0435	
12^h nachts	0,1346	0,0984	0,0260	0,0368	
		0,5656	0,3495	0,1706	

Die Betrachtung unserer Versuchszahlen ergibt, daß die Terpentininjektion ein temporäres Absinken der Harnmenge, der N- und der NaCl-Ausscheidung bewirkt hatte; dasselbe ist hinsichtlich der Harnmenge am wenigsten, hinsichtlich der Kochsalzausscheidung am deutlichsten ausgeprägt. Zieht man die um 8^h früh und 4^h nachm. gesammelten Harnmengen zusammen, so ergibt sich für den Vortag der Injektion eine NaCl-Ausscheidung von 0,3235, für den Tag nach der Injektion 0,3026, also etwa der gleiche Wert, für den Tag der Injektion selbst aber nur 0,1338, also weniger als die Hälfte. Die N-Ausscheidung zeigt ein ähnliches Verhalten.

Das Verhalten der NaCl-Ausscheidung wurde noch deutlicher, als wir der Nahrung Kochsalz zusetzten.

2. Versuch.

Der Hund vom Versuch 1 wurde täglich um 10^h abends mit 400 g Fleich unter Zulage von 1 g Kochsalz gefüttert. Am 9. VI. um 8^h früh intraperitoneale Injektion von 2 ccm Terpentinöl, um $11^3/_4{}^h$ subcutane Injektion von $3^1/_2$ mg Suprarenin. Der später gesammelte Harn war zuckerfrei.

Harnmenge:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8^h früh	143	147	160	130
				Inj. von Terpentin
4^h nachm.	90	87	117	60
10^h abends	50	55	57	56
	283	289	334	246

N-Ausscheidung:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8h früh	7,69	7,77	7,46	7,34 Inj. von Terpentin
4h nachm.	?	3,58	4,80	1,95
10h abends	2,22	1,94	2,31	2,22
		13,29	14,57	11,51

NaCl-Ausscheidung:

Harn entnommen am um	6. VI.	7. VI.	8. VI.	9. VI.
8h früh	0,5870	0,8673	0,5120	0,5525 Inj. von Terpentin
4h nachm.	0,6030	0,5046	0,6787	0,0780
11h abends	0,2475	0,1677	0,2109	0,0812
	1,4375	1,5396	1,4016	0,7117

In diesem Falle war der Effekt der Terpentininjektion ein außerordentlich eklatanter: wir finden in der nach der Injektion gesammelten Harnportion weniger als die Hälfte des N und weniger als $^1/_8$ des NaCl, wie in der analogen Harnportion des Vortages.

Zwei weitere Versuche analoger Art wurden mit der Injektion von Pankreas ausgeführt.

3. Versuch.

Hund erhält nach 3tägiger Vorperiode, wobei er regelmäßig um 10h nachts ebenso wie der Hund im 2. Versuche gefüttert wird, am 23. VI. 1910 um $9^1/_4$h früh 5 g Pankreas intraperitoneal, sodann um $12^1/_4$h mittags $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Der in der ersten Periode entleerte Harn ist zuckerfrei; in den beiden nächsten Perioden (4h nachm. bis 8h früh) sistiert die Harnsekretion gänzlich. Da der Hund am selben Abend die Nahrung verweigert, muß der Versuch abgebrochen werden.

Harnmenge:

Harn gesammelt am um	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
8h früh	117	119	121	→ B 161 + Injektion v. Pankreas	∅
4h nachm.	46	79	72	108	
12h nachts	45	46	A	∅	
	208	244			

N-Ausscheidung:

Harn gesammelt am	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
um					
8^h früh	4,43	4,74	5,13	→B 10,07	∅
				+ Injektion v. Pankreas	
4^h nachm.	1,91	2,49	2,58	2,03	
12^h nachts	1,06	0,38	A	∅	
	7,40	7,61			

NaCl-Ausscheidung:

Harn gesammelt am	20. VI.	21. VI.	22. VI.	23. VI.	24. VI.
um					
8^h früh	0,3920	0,5340	0,780	→B 0,9528	∅
				+ Injektion v. Pankreas	
4^h nachm.	0,4117	0,5372	0,3360	0,2484	
12^h nachts	0,0902	0,0759	A	∅	
	0,8939	1,1471			

Obiger Versuch ist recht instruktiv. Wir vermissen hier nach Pankreasinjektion und darauffolgender Suprarenininjektion zunächst jede Verminderung in der Menge der Harnflüssigkeit; auch die Menge des ausgeschiedenen Stickstoffes ist nicht vermindert. Dennoch ist die Suprareninglucosurie ausgeblieben, und gleichzeitig macht sich auch ein merkliches Zurückgehen der NaCl-Ausscheidung bemerkbar. Wie sehr aber die Nierenfunktion gelitten hat, geht schon daraus hervor, daß einige Stunden nach der Pankreassekretion die Harnbildung gänzlich sistiert, derart, daß über 16 Stunden lang Anurie besteht.

Auch in dem folgenden Versuche tritt die Erscheinung zutage, daß die Fähigkeit der Niere, Kochsalz zu eliminieren, erheblich gelitten haben kann, ohne daß eine Verminderung der ausgeschiedenen Flüssigkeitsmenge bemerkbar wäre.

4. Versuch.

Derselbe Hund, der zu den beiden vorbeschriebenen Terpentinversuchen gedient hatte, wurde wiederum täglich einmal um 12^h nachts mit 400 g rohen gehackten Fleisches unter Zugabe von 1 g Kochsalz gefüttert. Am 8. VII. um 9^h vormittags erhielt er 5 g Pankreas subcutan und um 2^h $3^1/_2$ mg Suprarenin subcutan. Der später ausgeschiedene Harn war zuckerfrei.

Harnmenge:

Harn gesammelt am um	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
8h früh	104	183	128	132
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	87	105	95	96
10h abends	38	44	38	45
	229	332	261	273

N-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
8h früh	8,25	6,52	6,70	6,98
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	5,34	7,06	7,02	4,28
10h abends	1,47	2,22	1,72	1,94
	15,06	15,80	15,44	13,20

NaCl-Ausscheidung:

Harn gesammelt am um	5. VII.	6. VII.	7. VII.	8. VII.
8h früh	0,692	0,314	0,563	0,488
				Injektion von Pankreas
4h nachm.	0,809	0,630	0,622	0,278
10h abends	0,253	0,320	0,285	0,042
	1,754	1,264	1,470	0,808

Wir legten uns nunmehr die Frage vor, ob eine heftige peritoneale Reizung auch unabhängig von dem Schmerzeffekte, nämlich am enthirnten bzw. narkotisierten Tiere, einen unmittelbaren Effekt im Sinne einer reflektorischen Hemmung der Diurese geltend macht.

5. Versuch.

Katze von $2^1/_2$ kg, enthirnt, künstliche Atmung. Der Harn wird aus einer Blasenkanüle aufgefangen und seine Entleerung mit Hilfe eines elektrischen Tropfenzählers registriert. Eine Salz-Diurese wurde [den Angaben von Magnus entsprechend] durch intravenöse Infusion einer 7 bis 8%igen Natriumsulfatlösung eingeleitet, und zwar ließen wir, um eine ganz gleichmäßige Infusion zu erzielen, nach dem Vorgange von Straub und Kretschmer[1]) die Salzlösung unter Druck durch eine Capillarröhre hindurch in die Vene einströmen (1,6 ccm pro Min.). Wir erzielten so eine recht gleichmäßige Diurese im Laufe von $^3/_4$ Stunden (4 bis 6 Tropfen pro Minute), die keine auffällige Veränderung erfuhr, als wir 1 ccm Terpentinöl intraperitoneal injiziert hatten.

[1]) Kretschmer, Dauernde Blutdrucksteigerung durch Adrenalin. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, 423, 1907.

6. Versuch.

Analoger Versuch an einer 3 kg schweren, in Morphin-Äthernarkose befindlichen Katze. Infusion von 1 ccm Na_2SO_4 7,8 °/₀ pro Minute. Lebhafte Diurese (40 bis 60 Tropfen in der Minute), die auch durch intraperitoneale Injektion von 5 ccm Trichloressigsäure 10 °/₀, sowie von 5 ccm konzentrierten Ammoniaks keine Einschränkung erfuhr.

Von einem etwa durch einen Krampf der Nierengefäße hervorgerufenen reflektorischen Stillstande der künstlich vermehrten Diurese ist hier also sicherlich keine Rede.

Wir haben nun aber weiterhin, um sowohl den Einfluß der Narkose als auch den einer künstlichen Diurese auszuschalten und um unsere Versuchstiere unter möglichst normalen physiologischen Bedingungen beobachten zu können, Hunden eine permanente Blasenfistel angelegt und dieselben einige Tage später in einem Gestelle, wie es Pawlow zur Fixierung seiner Magenfistelhunde anwendet, aufgestellt und so beobachtet, wobei der Harn in einem kleinen Meßzylinder aufgefangen wurde.

7. Versuch.

Mittelgroßer Hund, seit 1 Tag hungernd. Blasenfistel 3 Tage vorher angelegt. Hund wird um 11^h in das Pawlowsche Gestell gebracht. Die in 10 Minuten abgesonderte Harnmenge betrug: $11^h\ 12'$ bis $11^h\ 42'$: 1,7 ccm; $11^h\ 42'$ bis $11^h\ 57'$: 1,3 ccm; $11^h\ 57'$ bis $12^h\ 50'$: 1,1 ccm; $12^h\ 50'$ bis $1^h\ 10'$: 1,1 ccm; $1^h\ 10'$ bis $2^h\ 15'$: 1,1 ccm; $2^h\ 15'$ bis $2^h\ 55'$: 1,1 ccm; $2^h\ 55'$ bis $3^h\ 10'$: 1,2 ccm. Nunmehr wurde 1 ccm Terpentinöl injiziert. Es stellten sich heftige Schmerzensäußerungen nebst Würgen und Erbrechen ein, die später einer Apathie Platz machten. Die Harnabsonderung betrug $3^h\ 17'$ bis $3^h\ 27'$: 1,1 ccm; $3^h\ 27'$ bis $3^h\ 37'$: 4,4 ccm; $3^h\ 37'$ bis $3^h\ 47'$: 1,5 ccm; $3^h\ 47'$ bis $3^h\ 57'$: 1,6 ccm; $3^h\ 57'$ bis $5^h\ 17'$: 0,7 bis 1,1 ccm; $5^h\ 17'$ bis $6^h\ 27'$: 0,8 bis 1,0 ccm.

8. Versuch.

Der Versuch wird an demselben Hunde einige Tage später wiederholt. Derselbe wird um $10^h\ 30'$ in das Pawlowsche Gestell gebracht. Die Harnabsonderung beträgt $10^h\ 50'$ bis $11^h\ 14'$: 1,6 ccm; $11^h\ 14'$ bis 1^h: 1,2 bis 1,3 ccm in 10 Minuten. Nunmehr um $1^h\ 4'$ intraperitoneale Injektion von 1 ccm Terpentinöl: $1^h\ 4'$ bis $2^h\ 2'$: 1,1 ccm Harn in 10 Minuten; $2^h\ 2'$ bis $3^h\ 41'$: 1,1 ccm; $3^h\ 41'$ bis $6^h\ 24'$: 0,8 ccm; $6^h\ 24'$ bis $8^h\ 23'$: 0,7 ccm. (Der Hund stirbt in der folgenden Nacht.)

Sonach war auch unter möglichst normalen Verhältnissen von einer ausgiebigen Verminderung der Harnmenge durch den heftigen peritonealen Reiz nichts zu merken.

Nun hatten uns aber unsere oben mitgeteilten Versuche darüber belehrt, daß die Sekretionstätigkeit der Niere in bezug auf die Ausscheidung der gelösten Harnbestandteile eine weitgehende Alteration erfahren kann, ohne daß das Wassereliminationsvermögen deswegen eine auffallende Änderung zeigen müßte.

Wir haben daher an einem Blasenfistelhunde einen Versuch in der Art ausgeführt, daß nicht nur die Menge der Harnflüssigkeit gemessen, sondern auch der Kochsalzgehalt der einzelnen Harnportionen bestimmt wurde.

9. Versuch.

Ein Vorversuch ergibt zunächst, daß die Kochsalzausscheidung bei einem hungernden Blasenfistelhunde ausreichend gleichmäßig ist:

I. Periode in der Dauer von 1h 28′: Harnmenge 17,3 ccm. In 10 ccm Harn: 0,075 g Kochsalz.

II. Periode in der Dauer von 1h 53′: Harnmenge 17,0 ccm. In 10 ccm Harn: 0,089 g Kochsalz.

III. Periode in der Dauer von 1h 36′: Harnmenge 12,0 ccm. In 10 ccm Harn: 0,084 g Kochsalz.

Einige Tage später wurde der im Hungerzustande befindliche Hund neuerlich in das Gestell gebracht und die Wirkung einer Terpentin-Injektion in das Peritoneum beobachtet. (Dieselbe war unmittelbar von Schmerzensäußerungen, 3maligem Erbrechen, Abgang von Kot und Speichelsekretion begleitet.)

	Abgesond. Harnmenge in 10 Minuten	In 10 ccm Harn enthaltene NaCl-Menge	Im Laufe 1 Stunde wurden abgesondert:	
		NaCl	Wasser	Kochsalz
I. Periode 10h 5′ bis 11h 27′	Mittel: 2,0 ccm	0,121 g	12,2 ccm	+ 0,148 g
II. Periode 11h 27′ bis 12h 45′	1,7 „	0,136 g	10,3 „	+ 0,140 g
Terpentin-Injektion 1h 19′				
III. Periode 1h 19′ bis 3h 02′	1,3 „	0,052 g	7,6 „	+ 0,040 g
IV. Periode 3h 02′ bis 4h 42′	1,4 „	0,063 g	8,3 „	+ 0,052 g

Es tritt sonach auch hier wiederum dieselbe Erscheinung zutage, die wir bereits bei unseren früheren Versuchen beobachtet haben: Während die Menge des abgesonderten Harnwassers nur eine wenig auffallende Verminderung erfahren hatte, hat die Kochsalzausscheidung eine außerordentlich starke Einbuße erlitten, derart, daß auf der Höhe der Wirkung des peritonealen Reizes

weniger als $^1/_3$ des früheren Quantums in der Zeiteinheit eliminiert wurde.

Diese Beobachtung gibt uns nun auch den Schlüssel zum Verständnisse der Tatsache, wieso ein peritonealer Reiz, sei er nun durch die Injektion von Pankreasgewebe, von Terpentin, Aleuronat usw. bedingt, befähigt ist, die Suprareninglucosurie zu hemmen: Was für das Kochsalz gilt, wird sicherlich in noch höherem Grade für den Zucker gelten, der ja unter normalen Verhältnissen von der Niere zurückgehalten wird und erst dann, wenn der Blutzucker ein gewisses Niveau übersteigt, die Nierenepithelien zu durchdringen vermag. Ebenso wie die Niere unter dem Einflusse des peritonealen Reizes dem Kochsalze gegenüber in ihrer Leistung versagt, versagt sie eben auch dem Zucker gegenüber, derart, daß sie auf ein Blutzuckerniveau, das unter normalen Verhältnissen zu Glucosurie führt, jetzt nicht mehr mit Zuckerausscheidung reagiert.

Falls diese Auffassung richtig ist, bleibt also die Suprareninglucosurie nach intraperitonealer Pankreasinjektion infolge der verminderten Nierenleistung aus, trotzdem die Ausschüttung in Form von Glykogen in der Leber aufgestapelten Zuckers in normaler Weise erfolgt und das Blutzuckerniveau über die Norm gestiegen ist. Wir haben uns nun auch noch von der letztgenannten Tatsache überzeugt, um die Beweiskette zu schließen.

9. Versuch.

Um zunächst festzustellen, in welchem Umfange das Blutzuckerniveau eines Hundes auf eine an sich kleine Suprarenindosis, wie sie bei unseren Versuchen in Betracht kommt, reagiert, wurden einem 10 kg schweren Hunde 10 ccm Blut aus einem Einschnitte in das Ohr entnommen und in 3 ccm einer (frisch in einem Platintiegel bereiteten!) 4%igen Natriumfluoridlösung aufgefangen. Die Blutzuckerbestimmung wurde nach dem Schenckschen Verfahren durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, daß wir die Titration des Zuckers nach Bertrand vornehmen. Es fand sich so ein Blutzuckergehalt von 0,108%.

Eine Woche später erhielt derselbe Hund 5 mg Suprarenin subcutan, worauf er mit reichlicher Zuckerausscheidung reagierte. In einer $3^1/_4$ Stunden nach der Injektion entnommenen Blutprobe fand sich nunmehr 0,165% Zucker. Die Erhöhung des Blutzuckerniveaus ist hier nicht sehr hochgradig, offenbar deswegen, weil die Zuckerausschüttung nicht sehr schnell erfolgt.

Wir haben nun einem anderen Hunde von gleichem Gewichte 12 ccm Blut aus dem Ohre entnommen und darin 0,081 % Zucker gefunden.

6 Tage später erhielt der Hund um 11h vorm. 6 g steriles Pankreas vom Rinde intraperitoneal injiziert, um 4h nachm. 5 mg Suprarenin subcutan; um 7 1/2h abends wurden ihm 10 ccm Blut entnommen. Es fand sich darin ein Zuckergehalt von 0,14 %.

Eine merkliche Erhöhung des Blutzuckerniveaus hatte sich hier also eingestellt, trotzdem der am nächsten Tage gesammelte Harn sich zuckerfrei erwies.

IV. Schlußfolgerungen.

Wir gelangen sonach zu dem Schlußergebnisse, daß das Ausbleiben der Suprareninglucosurie nach intraperitonealer Injektion von Pankreaspräparaten durch eine infolge des peritotonealen Reizes sich einstellende Alteration der Nierenfunktion hinreichend erklärt ist und daß diese Erscheinung keineswegs die Annahme eines geheimnisvollen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere erfordert.

Diese Erklärung ist nicht ohne weiteres auf jene Versuche Zuelzers und seiner Nachfolger anwendbar, bei denen die Pankreaspräparate nicht intraperitoneal, sondern subcutan bzw. intravenös beigebracht wurden.

Man wird jedoch bei Beurteilung dieser Versuche immerhin alles das in Betracht ziehen müssen, was wir über die hochgradige Toxizität der Pankreaspräparate bei jeder Applikationsform wissen.[1])

Wir erinnern z. B. daran, daß Achalme nach subcutaner Injektion von Pankreatinlösungen bei Meerschweinchen ausgedehnte Nekrosen erhielt und daß v. Bergmann Hunde, denen er ohne entsprechende Vorbehandlung das ganze Pankreas eines fremden Individuums implantiert hatte, stets nach längstens 20 Stunden zugrunde gehen sah. Wir weisen ferner darauf hin, daß auch Zuelzer[2]) jene Menschen, denen er seine durch Vorbehandlung teilweise entgifteten Pankreaspräparate intravenös beigebracht hatte, darauf vielfach mit Schüttelfrost, mehrtägigem Fieber und schlechtem Befinden reagieren sah.

---

[1]) Vgl. die Literaturangaben in unserer Arbeit. Diese Zeitschr. 20, 385.

[2]) l. c.

Wir erinnern weiterhin an die oben zitierten Beobachtungen, aus denen zur Genüge hervorgeht, daß Schädlichkeiten der verschiedensten Art (wie Fieber, Nierenschädigung und Diuresenhemmung, Pepton, Hirudin und andere Lymphagoga) die Suprareninglucosurie zu hemmen vermögen.[1]) Es liegt wohl auf der Hand, daß Schädlichkeiten ähnlicher Art sehr wohl auch bei der subcutanen und intravenösen Applikation von Pankreaspräparaten eine gewichtige Rolle spielen können; jedenfalls sind eingehende und sorgfältige Untersuchungen erforderlich, um die Fehlerquellen dieser Art mit Sicherheit auszuschließen.

Ohne also dem Ergebnisse derartiger Untersuchungen in dem einen oder anderen Sinne vorgreifen zu wollen, halten wir vorläufig den Beweis für einen Antagonismus zwischen den „Hormonen" des Pankreas und der Nebenniere durch die vorliegenden Beobachtungen über Hemmung der Suprareninglucosurie durch Injektion von Pankreaspräparaten keinesfalls für erbracht.

Daß der Einfluß des lebenden Pankreas auf den Kohlenhydratstoffwechsel, der zu den bestfundierten Tatsachen der Physiologie gehört, durch unsere Feststellungen nicht tangiert wird, bedarf wohl kaum einer Erwähnung. Nicht um diese Frage handelt es sich, sondern um die Frage, ob es möglich sei, die mächtige Wirkung, die das Pankreas zweifellos auf den Kohlenhydratstoffwechsel im lebenden Organismus ausübt, sozusagen an das Reagensglas zu bannen und auf präparatorischem Wege wirksame „Pankreashormone" zu bereiten — und in dieser Hinsicht scheinen uns allerdings Zweifel sehr am Platze zu sein.

Zum Schlusse möchten wir noch darauf hinweisen, daß man fortan bei jeder die Zuckerausscheidung betreffenden Untersuchung mit der Tatsache zu rechnen haben wird, daß Schädlichkeiten und Eingriffe, welche die Ausscheidung des Harnwassers nicht einmal merklich zu beeinflussen brauchen,

[1]) Vgl. diesbezüglich den Artikel von Morawitz über Kochsalzsekretion im Fieber in Oppenheimers Handb. d. Biochem. 4, 2. Teil, S. 287 ff, sowie auch die Angaben von v. Noorden über den vermindernden Einfluß mancher interkurrenter Krankheiten, insbesondere von Nierenaffektionen auf die Zuckerausscheidung beim Diabetes im Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden, 2, 67, 1907.

dennoch die Nierenfunktion im Sinne einer Hemmung der Zuckerelimination verändern und schwerwiegende Täuschungen in bezug auf die Vorgänge des Kohlenhydratstoffwechsels herbeiführen können. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen, gerade aus den letzten Jahren, die den Einfluß verschiedener Organe sowie toxikologischer und operativer Eingriffe auf die Bildung und den Verbrauch des Zuckers zum Gegenstande haben, bedürfen von diesem Gesichtspunkte aus einer Revision.

Zusammenfassung.

1. Die Beobachtungen Zuelzers u. a. über die Hemmung der Suprareninglucosurie durch Injektion von Pankreasgewebe werden bestätigt. Es ergibt sich, daß diese Hemmung auch nach ausgiebiger immunisatorischer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Trypsin- bzw. Pankreaspräparaten prompt erfolgt.

2. Eine analoge Hemmung der Suprareninglucosurie kann auch erzielt werden, wenn man, anstatt Pankreasgewebe intraperitoneal zu injizieren, einen peritonealen Reizzustand durch Injektion von Terpentinöl oder Aleuronat herbeiführt.

3. Ein derartiger peritonealer Reizzustand vermag, ohne daß die Ausscheidung der Harnflüssigkeit als solche dabei eine auffallende Verminderung erfahren müßte, die Sekretionstätigkeit der Niere derart zu beeinflussen, daß die Ausscheidung der gelösten Harnbestandteile erheblich abnimmt. Eine solche von der Menge des Harnwassers unabhängige Abnahme konnte sowohl für den Stickstoff als auch besonders für die Chloride des Harnes direkt festgestellt werden.

4. Die Hemmung der Suprareninglucosurie durch intraperitoneale Injektionen von Pankreasgewebe findet durch eine derartige Alteration der sekretorischen Nierentätigkeit eine ausreichende Erklärung, ohne daß die Annahme eines Antagonismus spezifischer, den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussender Pankreas- und Nebennierenhormone herangezogen werden müßte.

5. Die Annahme, daß die Hemmung der Suprareninglucosurie durch subcutane Injektionen von Pankreaspräparaten auf einen derartigen Antagonismus zurückzuführen ist, setzt

die bisher mangelnde Beweisführung voraus, daß keine der Schädlichkeiten, die angesichts der hochgradigen Toxizität der Pankreaspräparate hier in Betracht kommen (wie z. B. Fieber, Alterationen der Nierentätigkeit) für die in Rede stehende Erscheinung eine ausreichende Erklärung bietet.

6. Die Nichtbeachtung der Tatsache, daß die verschiedensten Schädlichkeiten und Eingriffe, welche die Ausscheidung des Harnwassers nicht einmal merklich zu beeinflussen brauchen, dennoch die Nierenfunktion im Sinne einer Hemmung der Zuckerelimination weitgehend zu verändern vermögen, kann bei experimentellen Arbeiten, die den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Kohlenhydratstoffwechsel betreffen, zu groben Täuschungen Anlaß geben.

Zur Kenntnis der Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren.

Von

K. Kawashima (Tokio).

(Aus der Bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 18. Januar 1911.)

In einer früher erschienenen Arbeit hat von Poggenpohl[1]) über Untersuchungen berichtet, die einige die Bindungsweise hämolytischer Amboceptoren betreffende Fragen zum Gegenstand hatten. Es hatte sich gezeigt, daß zwischen den von Kaninchen und von Ziegen stammenden Amboceptoren, die durch Vorbehandlung mit derselben Blutart entstanden sind, charakteristische Differenzen bestehen. Von den von der Ziege stammenden Amboceptoren wird offenbar stets nur ungefähr eine lösende Dosis von den Blutkörperchen gebunden, auch wenn ihnen ein erhebliches Multiplum derselben dargeboten wird. Auf der anderen Seite binden die Blutkörperchen eine wechselnde Zahl von Einheiten der vom Kaninchen stammenden Amboceptoren, in jedem Fall eine größere Anzahl derselben. Beide Typen der Bindungsweise waren bereits aus den früheren Mitteilungen über Hämolysine von Ehrlich und Morgenroth[2]) bekannt. Jedoch erst jetzt konnte die Annahme ausgesprochen werden, daß diese verschiedene Art der Bindung nicht von der Art der bindenden Blutkörperchen, sondern von der Spezies des die Amboceptoren liefernden Tieres abhängig und für diese bezeichnend sei.

---

[1]) Poggenpohl, diese Zeitschr. 22, 1909.

[2]) Ehrlich und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 21 und 22.

Aus technischen Gründen wurden bisher meist Kaninchen, seltener Ziegen, zur Gewinnung der hämolytischen Amboceptoren benutzt, und deshalb liegen in dieser Hinsicht über die Amboceptoren anderer Tiergattungen nur geringe Materialien vor. Vor allem fehlt es an Angaben, welchem der beiden hier genannten Typen sich die Amboceptoren anderer Tierspezies anschließen.

Eine Ausfüllung dieser Lücke erscheint wünschenswert, und ich habe deshalb das Verhalten einiger vom Hunde stammenden Amboceptoren untersucht.

Das Serum der zur Gewinnung der Amboceptoren dienenden beiden Hunde wurde zunächst vor der Immunisierung untersucht, und zwar zuerst im aktiven Zustande und dann nach der Inaktivierung durch halbstündiges Erwärmen auf 56°. Es zeigte sich, daß es in aktivem Zustande auf Ziegenblut die bekannte, ziemlich starke hämolytische Wirkung ausübt, daß es aber, einmal inaktiviert, durch Meerschweinchenserum in der üblichen Weise nicht reaktiviert werden kann. Wir geben unten die Versuche wieder, zu denen je 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung von 2mal mit Kochsalzlösung gewaschenem Ziegenblut verwendet wurde; als Komplement diente 1 ccm frischen Meerschweinchenserums.

Menge des normalen Hundeserums ccm	Hund I		Hund II	
	aktiv	inaktiv + Komplement	aktiv	inaktiv + Komplement
0,5	komplett	wenig	komplett	sehr wenig
0,3	"	"	"	" "
0,2	"	"	"	" "
0,1	fast komplett	Spur	Schleier	Spur
0,5 1/10	wenig	"	stark	Spürchen
0,25 1/10	Spur	Spürchen	Spürchen	minimal Spürchen
0,1 1/10	0	0	0	0
0 (Kompl. allein)	0		0	
0	0		0	

Es geht aus diesem Versuch die für die Beurteilung der weiteren Ergebnisse als wesentlich in Betracht kommende Tatsache hervor, daß der im normalen Hundeserum vorhandene, auf Ziegenblut wirkende Amboceptor durch das Inaktivieren des Serums ausgeschaltet wird, also in den folgenden Versuchen nicht in Frage kommt.

Dem Hund I wurden am 29. IV. und 18. V. je 40 ccm Ziegenblut subcutan injiziert, am 31. V. nochmals 27 ccm, am 6. VI. wurde er entblutet. Hund II erhielt auch subcutan am 5. VII. 30 ccm und am 12. VII. 45 ccm Ziegenblut, am 19. VII. wurde er entblutet. Die komplett lösende Dosis des Amboceptors von Hund I für 1 ccm 5%iges Ziegenblut, bei Anwendung von 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement betrug 0,02. Bei Hund II 0,003 (später 0,004).

Der Bindungsversuch wurde in der Weise angestellt, daß zu 5 ccm der 5%igen Blutaufschwemmung wechselnde Mengen des Amboceptors zugesetzt wurden. Die Gemische wurden unter öfterem Schütteln 1 Stunde bei 37° im Brutschrank gehalten und hierauf das Sediment abzentrifugiert. Das Sediment wurde 2mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, hernach auf das ursprüngliche Volum aufgefüllt und zu je 1 ccm desselben 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt. Von dem Abguß wurden wechselnde Mengen zu 1 ccm 5%igen Ziegenblutes, zusammen mit je 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt.

Die Mengen des zum ersten Versuch benutzten Serums des Hundes I sind aus untenstehender Tabelle zu entnehmen, ebenso das Resultat der Untersuchung des Abgusses. Das Sediment wurde in allen Fällen nach Komplementzusatz vollständig gelöst.

	Menge des 5%igen Ziegenblutes ccm		Menge des Ziegen-Hunde-Amboceptors ccm		Menge der physiol. NaCl-Lösung ccm		Zahl der lösenden Dosen
1.	5,0	+	0,5	+	0,5	d. h.	5 f.
2.	5,0	+	0,6	+	0,4		6 f.
3.	5,0	+	0,7	+	0,3		7 f.
4.	5,0	+	1,0	+	0		10 f.

Menge des Abgusses ccm	Ursprüngl. lösende Dosis 5 f.	6 f.	7 f.	10 f.
1,0	Spürchen	wenig	wenig	wenig
0,5	minimal Spürchen	Spürchen	Spürchen	Spürchen
0	0	—	—	—
0 (Blut allein)	0	—	—	—

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß die Blutkörperchen von diesem Amboceptor mindestens das 10fache der lösenden Dosis zu binden vermögen.

Ein zweiter Versuch mit dem Amboceptor des Hundes II, der unter denselben Bedingungen ausgeführt wurde, ergab ein

Resultat, das mit dem eben geschilderten in Einklang stand. Es wurden nur 2 ccm 5%igen Ziegenblutes verwendet, die dann auf 3 ccm aufgefüllt wurden. Zu 1,5 ccm des Abgusses wurden 1 ccm frischen 5%igen Ziegenblutes und 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugesetzt. 1 ccm 2mal gewaschenen Sediments wurde bei Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenserum vollständig gelöst. Das Verhalten des Abgusses ergibt sich aus folgender Zusammenstellung:

Zahl der lösenden Dosen	Abguß
10 f.	stark
11 f.	Schleier
12 f.	komplett
13 f.	"
14 f.	"
15 f.	"

Es geht aus diesem Versuch hervor, daß hier das 10fache der lösenden Dosis nicht mehr vollständig gebunden wird.

Es scheint also, daß sich der vom Hunde stammende, auf Ziegenblut wirkende Amboceptor dem Typus der vom Kaninchen stammenden Amboceptoren anschließt. Das Verhalten der gebundenen Amboceptoren (vom Kaninchen stammend) nach Zufügen neuer Blutkörperchen wurde in Anschluß an Morgenroths[1]) frühere Versuche von Philosophow[2]) eingehender untersucht. Nachdem auch für Hundeamboceptoren die Bindung eines Multiplums der Amboceptoreinheit festgestellt war, war die Möglichkeit gegeben, auch diesen Versuch auszuführen und so zu einer Vorstellung von der Festigkeit der Amboceptorbindung in diesem Falle zu gelangen.

Zu je 5 ccm des 5%igen Ziegenblutes wurden wechselnde Mengen des Amboceptors zugefügt (durch Kochsalzlösungzusatz betrug das Gesamtvolum 6 ccm). Nach 1stündigem Verweilen bei 37° wurde abzentrifugiert, 2mal mit Kochsalzlösung gewaschen und wieder auf das ursprüngliche Volum von 5 ccm aufgefüllt. Die Bindung wurde in der Weise geprüft, daß zu 1,2 ccm des Abgusses 1 ccm 5%igen Blutes und 0,1 ccm Meerschweinchenserum zugesetzt wurde. Zu je 1 ccm des gewaschenen

[1]) Morgenroth, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 2.

[2]) Philosophow, diese Zeitschr. 20, 1909.

Sediments wurde dann von neuem 1,0 ccm frischen Blutes zugesetzt, und nachdem diese Gemische 30 resp. 60 Minuten im Wasserbade bei 40° verweilt hatten, 0,2 ccm Meerschweinchenserum als Komplement zugefügt. Aus der Untersuchung des Abgusses ist zu ersehen, daß jedesmal der größte Teil des zugefügten Amboceptors, in prinzipieller Übereinstimmung mit dem oben geschilderten Versuch, der wie der hier beschriebene mit Hundeserum I angestellt wurde, gebunden wird. Das Resultat des Überspringungsversuchs ist gleichfalls in der untenstehenden Tabelle enthalten. Es zeigt sich, daß nach 30 Minuten der Prozeß im wesentlichen vollendet ist, und daß schon bei ursprünglicher Bindung von drei lösenden Dosen eine lösende Dosis an die neu zugefügten Blutkörperchen abgegeben wird. Eine mehrmalige Wiederholung des Versuchs ergab das gleiche Resultat.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment (mit M. S. 0,2 ccm)		Abguß (mit M. S. 0,1 ccm)
	30 Min. bei 40°	60 Min. bei 40°	60 Min. bei 40°
2 f.	Schleier	fast ganz komplett	0
3 f.	komplett	komplett	minimal Spürchen
4 f.	„	„	Spürchen
5 f.	„	„	Kuppe
6 f.	„	„	mäßig
7 f.	„	„	stark

Kontrolle:

Frisches 5%iges Ziegenblut 1 ccm + NaCl-Lös. 1,0 + M. S. 0,1 = 0

„ „ „ 1 „ + „ 1,1 = 0

Mit derselben Versuchsanordnung wurde das Serum von Hund II geprüft. Die lösende Dosis für 1,0 ccm Blut betrug 0,004. Wie aus der untenstehenden Tabelle hervorgeht, wurden ursprünglich 6 lösende Dosen bis auf eine Spur gebunden, und von 3 lösenden Dosen geht wiederum eine auf die neu zugefügten Blutkörperchen über.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment (1^h bei 40°)	Abguß (1^h bei 40°)
1 f.	stark	0
2 f.	Schleier	Spürchen
3 f.	komplett	„
4 f.	„	Spur
5 f.	„	„
6 f.	„	„

Wir lassen das Resultat eines vergleichenden Versuches folgen, der gleichzeitig mit dem Amboceptor von Hund II (lösende Dosis $0,3^1/_{100}$) und dem Amboceptor eines mit Ziegenblut behandelten Kaninchens (lösende Dosis $0,6^1/_{1000}$) vorgenommen wurde. Der Übergang vollzog sich, wie in den früheren Versuchen, bei 40° in 1 Stunde. Kontrollversuche mit dem Abguß ergaben in beiden Fällen eine bis auf Spuren vollständige Bindung von 5 lösenden Dosen.

Wie aus der untenstehenden Tabelle zu ersehen ist, verhalten sich beide Amboceptoren, wie auch nach den vorausgehenden Versuchen zu erwarten war, im wesentlichen gleichartig; ein gewisser Unterschied, der mit früheren Erfahrungen an Kaninchenamboceptoren übereinstimmt, dokumentiert sich darin, daß bei diesen erst nach Bindung von 4 lösenden Dosen eine lösende Dosis an neue Blutkörperchen abgegeben wird, während dies beim Hundeamboceptor bei 2 bis 3 lösenden Dosen bereits der Fall ist.

Zahl der lösenden Dosen	Sediment: Hunde-amboceptor	Sediment: Kaninchen-amboceptor
1 f.	Schleier	stark
2 f.	fast komplett	"
3 f.	komplett	fast komplett
4 f.	"	komplett
5 f.	"	"

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Morgenroth, die dann durch die Untersuchungen von Philosophow ergänzt wurden, konnten auch wir in unserem Fall eine Abhängigkeit des Überspringens der Amboceptoren von der Temperatur beobachten.

Dauer im Wasserbade (40°) oder im Eiswasser (0°)	6 fach sensibilisiertes Sediment	
	40°	0°
sofort	fast ganz kompl.	fast ganz kompl.
5′	komplett	" " "
15′	"	Schleier
25′	"	"
30′	"	"

Wie die Tabelle zeigt, ist bei 0° auch nach 30 Minuten ein vollständiger Übergang des Amboceptors noch nicht erfolgt, während bei 40° schon nach 5 Minuten eine lösende Dosis übergegangen ist. Der Vorgang vollzieht sich also bei niedriger Temperatur mit geringerer Geschwindigkeit.

Es geht also aus unseren Versuchen hervor, daß die beiden untersuchten Amboceptoren vom Hunde sich in ihren wesentlichen Bindungseigenschaften den vom Kaninchen stammenden, auf die gleiche Blutart (Ziegenblut) wirkenden Amboceptoren anschließen.

Studien über Antigenbildung in eiweißfreien Nährmedien.

I. Mitteilung.

Beiträge zur Kenntnis des Tuberkulins.

Von

Ernst Löwenstein und Ernst P. Pick.

(Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut in Wien.)

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

Die Stoffe, aus denen die Bakterienzelle ihre Leibesbestandteile aufbaut, sind vielfachen Studien unterworfen worden; die dabei gewonnenen Tatsachen bilden zum Teil die Grundlagen der modernen Bakteriologie. Während die Umsetzungen, welche hierbei die Hauptbestandteile der Nährmedien, die Eiweißkörper, Fette und Kohlenhydrate erfahren, in vielen Arbeiten näher charakterisiert worden sind, blieben unsere Kenntnisse über das für das Leben der Bakterien und das Entstehen ihrer Stoffwechselprodukte nötige Existenzminmum sehr bescheiden. Gerade das Wachstum auf den einfach zusammengesetzten Nährmedien bietet aber für die Aufklärung der Stoffwechselvorgänge die besten Bedingungen.

Der Grund, daß das Studium in dieser Richtung lange keine befriedigenden Erfolge ergeben hat, liegt darin, daß die verschiedenen Bakterien auf diesen einfachen Nährböden oft entweder gar nicht oder nur kümmerlich gedeihen, und dementsprechend die Bildung der bekannten giftigen Stoffwechselprodukte nur ein bescheidenes Maß erreicht oder völlig ausbleibt. Eine Reihe sehr wichtiger Versuche in dieser Richtung verdanken wir Kühne, Fermi, Uschinsky, C. Fraenkel, Proskauer und Beck, Carbone u. a.[1]). Seit dem Erscheinen

[1]) Siehe Kruse, Allgemeine Mikrobiologie; Vogel, 1910. Daselbst die einschlägige Literatur.

dieser älteren Arbeiten hat sich die Kenntnis der giftigen Stoffwechselprodukte wesentlich vermehrt und die Technik ihres Nachweises verfeinert; deshalb schien uns eine Wiederaufnahme dieser Arbeiten nicht aussichtslos.

Es ist von vornherein klar, daß für das Studium der Giftbildung in einfach zusammengesetzten Nährmedien nur diejenigen Bakterienprodukte sich eignen, die als Stoffwechselprodukte sensu strictiori aufzufassen sind und sich nicht ohne weiteres durch die Nährlösungen selbst aus den Bakterienleibern extrahieren lassen; wir kennen eine Reihe von giftigen und ungiftigen Bakterienantigenen, die durch physiologische Kochsalzlösung, verdünnte Alkalien oder Säuren leicht zu extrahieren sind und nichts anderes darstellen, als in Lösung gegangene Leibesbestandteile. Diese künstliche Extraktion ist vielfach in ihrem Endeffekt gleichzusetzen den in jeder gewachsenen Kultur spontan sich abspielenden Prozessen, durch welche größere oder geringere Mengen der Leibessubstanz in Lösung gehen, abgesehen von den als Autolyse bezeichneten Zerfallsprozessen, durch die ebenfalls eine Reihe von chemisch und pharmakologisch verschiedenwertigen Produkten in der Nährflüssigkeit entstehen.

Für das Studium giftiger, antigen wirkender Stoffwechselprodukte ist es daher von kardinaler Bedeutung, daß nur solche Antigene für die Lösung dieser Frage herangezogen werden, bei denen der eben erörterte Entstehungsmodus ausgeschlossen ist. Wissen wir doch, daß Antigene für Agglutinine, Präcipitine, Hämolysine und gewisse toxisch wirkende Antigene aus Cholera-, Typhus-, Coli-, Dysenteriebakterien sich ebenso leicht durch kurze Extraktion junger Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung gewinnen lassen, wie aus den Tonfiltraten alter Kulturen. Die durch Extraktion gewonnenen Antigene sind vielfach sehr eiweißarm, ja manchmal lassen sich Antigene isolieren, die keine Eiweißreaktion aufweisen [E. P. Pick[1])]. Alle derartigen Produkte sind jedoch für das Studium der vorliegenden Frage ungeeignet.

Die größtmöglichen Garantien für das Studium der natürlichen Antigenbildung sind dann gegeben, wenn in Medien bekannter Zusammensetzung Bakterien gezüchtet werden, welche

---

[1]) E. P. Pick, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1.

keine Extraktstoffe abgeben, sondern nur spezifische Stoffwechselprodukte, die an das Leben und Wachstum dieser Bakterien geknüpft sind. Diese Voraussetzung schien uns am besten bei dem Tuberkelbacillus zuzutreffen; deshalb haben wir für unsere Versuche die Züchtung des Tuberkelbacillus auf eiweißfreien Nährböden gewählt.

I. Versuche über die Extrahierbarkeit des Tuberkulins aus den Bacillenleibern.

Obwohl aus zahlreichen Versuchen[1]) mit großer Wahrscheinlichkeit hervorgeht, daß durch einfache Extraktion aus den Tuberkelbacillenleibern Stoffe vom Giftcharakter des Alttuberkulins nicht dargestellt werden können, so war es im Hinblicke auf die eingangs aufgeworfene Frage für uns von großer Wichtigkeit, mit Sicherheit den Nachweis führen zu können, daß derartige Körper durch die von uns verwendete Nährlösung aus den Bakterien nicht extrahierbar sind, sondern echte Stoffwechselprodukte derselben darstellen. Zu diesem Behufe wurden 2,7 g auf Bouillon-Glycerin gezüchteter, durch Sterilisation im Dampfe abgetöteter und zwischen Filtrierpapier gut abgepreßter Tuberkelbacillen in 100 ccm der später zu beschreibenden Asparaginnährlösung aufgeschwemmt und 2 Stunden im Kolben auf dem Wasserbade gekocht, nachdem vielfache eigene wie fremde Versuche ergeben hatten, daß die Tuberkulinwirkung selbst durch länger währende Hitze strömenden Dampfes nicht nennenswert beeinflußt wird. Das hierauf durch Papierfiltration von den Bakterienleibern getrennte, nahezu klare Filtrat wurde nach Entnahme einer ca. 4 ccm fassenden Probe (Lösung a) in einer Schale auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft und der Rückstand in 13 ccm Wasser aufgenommen (Lösung b). Die Prüfung der beiden Flüssigkeiten auf Tuberkulinwirkung wurde mittels der intracutanen Methode an tuberkulösen Meerschweinchen folgendermaßen angestellt:

5 tuberkulöse Meerschweinchen, die 8 Wochen vorher intraperitoneal mit je $^{1}/_{10}$ Öse einer 14tägigen Glycerin-Agar-Kultur humaner Tuberkelbacillen infiziert worden waren, wurden geimpft: 1. mit der Lösung a des nicht eingeengten Filtrates

---

[1]) Siehe Fußnote Seite 142.

und 2. mit der Lösung b des konzentrierten Filtrates. Alle 5 Meerschweinchen zeigten nach 12, 24 und 48 Stunden auf intracutane Injektion der Lösung a keine Spur einer Reaktion; auf Injektion des konzentrierten Filtrates (Lösung b) reagierten 4 Meerschweinchen ebenfalls nicht, 1 Meerschweinchen zeigte an der Impfstelle eine Rötung und Infiltration ohne Nekrose.

Aus diesen Versuchen scheint uns eindeutig hervorzugehen, daß unsere Nährlösung nicht imstande ist, aus den Bakterienleibern Körper von typischer Tuberkulinwirkung zu extrahieren. Die äußerst unsichere Wirkung des konzentrierten Extraktes, wie sie sich bei einem von 5 Meerschweinchen in der Rötung und Infiltration der Impfstelle manifestierte, scheint viel eher auf den den Tuberkelbacillen anhaftenden Resten der wirksamen alten Kulturflüssigkeit zu beruhen als auf Körpern, die durch unsere Nährlösung den Bakterienleibern entzogen worden wären. Erscheinen daher gut nachweisbare Gifte in der von uns benutzten Nährlösung, so müssen wir annehmen, daß dieselben echte Stoffwechselprodukte der Tuberkelbacillen darstellen und an die Lebenstätigkeit derselben geknüpft sind.

II. Methode der Züchtung des Tuberkelbacillus und Darstellung des Tuberkulins aus eiweißfreien Nährmedien.

Das Studium der Tuberkulinbildung auf eiweißfreien Nährböden schien besonders geeignet zur Klärung der Frage, inwieweit ohne Beeinträchtigung der Giftbildung der Nährboden vereinfacht werden könne, und weiter, ob das so entstandene Gift einen chemisch einfacheren Körper darstelle als das auf eiweißhaltigem Nährboden gebildete.

In Bestätigung der Versuche von Proskauer und Beck, C. Fraenkel, Kühne, Jochmann[1]), Ruppel und Rickmann[2]) hat der eine von uns (L.) gezeigt, daß der Tuberkelbacillus auf eiweißfreien Nährböden sich vorzüglich weiter entwickelt. Zur Herstellung des Tuberkulins diente folgende Nährlösung, welche in 1 Liter Wasser enthielt:

---

[1]) Jochmann, Berichte des Kongresses f. innere Medizin, Wiesbaden 1910 und Deutsche med. Wochenschr. 1910.

[2]) Ruppel und Rickmann, Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1910.

6 g Asparagin,
6 g milchsaures Ammon,
3 g neutrales Natriumphosphat,
6 g Kochsalz,
40 g Glycerin.

Während in der ersten und zweiten Generation das Wachstum ein kümmerliches war, der Bacillenrasen höchstens die Hälfte der Oberfläche einnahm, wurde in der sechsten Generation die Nährlösung völlig von einem etwas dünneren Rasen als bei der Glycerinbouillon bedeckt. Nach 3 Monate langem Wachstum nahm die Nährflüssigkeit einen gelben Ton an, der mit dem Alter der Kultur sich verstärkte.

Nach 3 bis 5 Monate langem Stehen im Brutschrank wurden gut gewachsene Kulturen teils durch Reichelkerzen, teils durch Papier filtriert und in dem Filtrate das Tuberkulin stets an tuberkulösen Meerschweinchen durch intracutane oder intraperitoneale Injektion bestimmt. Es ergab sich, daß in dieser Nährflüssigkeit derselbe spezifische Körper gebildet wird, den Robert Koch uns als Tuberkulin kennen gelehrt hat, und der sich bereits durch Kühne und in letzter Zeit durch Jochmann aus eiweißfreien Nährmedien hat herstellen lassen.

III. Die chemische Natur des Tuberkulins.

Wie die Durchsicht der einschlägigen Literatur über Tuberkulin lehrt, lassen sich die folgenden Tatsachen feststellen. Robert Koch selbst hat schon 1891 über die Natur des Tuberkulins Untersuchungen angestellt und gefunden, daß der auf eiweißhaltigen Nährlösungen gewonnene spezifische Körper alle Eiweißreaktionen gebe, den Albumosen und Peptonen am nächsten stehe, von den Eiweißkörpern jedoch sich durch seine Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen (mehrstündige Einwirkung von 120°) und seine leichte Dialysierbarkeit unterscheide, von der Peptongruppe durch seine Fällbarkeit mit Eisenacetat.

Von Kühne[1]) stammt der erste Versuch, ein Tuberkulin aus eiweißfreien Nährböden zu gewinnen. Er verwendete einen aus Leucin, Tyrosin, Asparagin, schleimsaurem Ammoniak, Taurin, Glycerin, Chlornatrium und der Asche von Liebig-

[1]) W. Kühne, Zeitschr. f. Biol. 30, 221, 1893.

schem Fleischextrakt zusammengesetzten Nährboden; die nach 2 Monate dauerndem Wachstum abfiltrierte Lösung enthielt Spuren von Albuminstoffen, keine Albumosen oder Peptone und sie wirkte, wie Kochs Untersuchungen ergeben hatten, ebenso temperatursteigernd wie das Ausgangspräparat. Kühne kam zu dem Schlusse, daß der wirksame Körper nicht isoliert sei, sondern allen von ihm dargestellten eiweißartigen Stoffen nur anhafte. Diese Untersuchungen Kühnes waren durch die damalige Prüfungstechnik des Tuberkulins sehr erschwert, da als ein einziges Kriterium der spezifischen Wirkung die Temperatursteigerung beim tuberkulösen Menschen gelten mußte.

Merkwürdigerweise wurde in der Folge der von Kühne beschrittene Weg bald wieder verlassen; denn alle anderen Untersuchungen sind am Original-Alttuberkulin, also an eiweißhaltigen Kulturflüssigkeiten, angestellt; es ist daher nicht verwunderlich, wenn die Untersuchungen das Resultat ergaben, daß der wirksame Bestandteil des Tuberkulins ein Eiweißkörper sei. So vertritt z. B. Matthes[1]) die Anschauung, daß die Wirkung des Tuberkulins am Pepton hänge, ja direkt dem Peptongehalt entspreche; Th. Pfeiffer[2]) und seine Mitarbeiter nehmen auf Grund der in jüngster Zeit durchgeführten Spaltungsversuche mit Pepsin, Pankreatin und Erepsin an, daß die Albumosen die wirksame Substanz seien.

Unsere eigenen Versuche knüpfen an die Untersuchungen Kühnes in eiweißfreien Nährlösungen an. Es war zunächst die Frage zu entscheiden, ob in der oben beschriebenen Nährlösung, in welcher mittels der intracutanen und intraperitonealen Injektion einwandfrei wirksames Tuberkulin nachgewiesen werden konnte, auch Eiweißkörper vorhanden seien. Zur Entscheidung dieser Frage wurden mit der von den Tuberkelbacillen abfiltrierten Lösung folgende Reaktionen angestellt:

1. Kochen bei neutraler und saurer Reaktion ergab keine Trübung.

2. Die Biuretprobe, als Schichtprobe aufgestellt, blieb negativ.

---

[1]) M. Matthes, Arch. f. klin. Med. 54, 66, 1895.

[2]) Th. Pfeiffer und H. Trunk, Zeitschr. f. Tuberk. 12, 177, 1908 und 18, 465, 1909. — Th. Pfeiffer und R. Persch, Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 33.

3. Die Millonsche Reaktion blieb negativ.

4. Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe: negativ.

5. Bleiacetat und Natronlauge: keine Dunkelfärbung beim Kochen.

6. Ammonsulfat bei voller Sättigung und wechselnder Reaktion: keine Fällung.

7. Molischs Reaktion ergibt eine intensive Violettfärbung.

8. Orcin-Salzsäurereaktion fällt negativ aus.

9. Die Flüssigkeit ist nicht imstande, Kupfersulfat in alkalischer Lösung zu reduzieren.

10. 95%iger Alkohol, im Überschuß zugesetzt, ergibt keine Fällung.

Nachdem wir uns durch Versuche überzeugt hatten, daß die Wirksamkeit unseres Tuberkulins selbst im strömenden Dampfe durch 2 Stunden nicht eine Einbuße erleidet, wurden die Kulturfiltrate auf dem Wasserbade bis zur Sirupdicke eingedampft; die zur Lösung des Rückstandes nötige Wassermenge entsprach einer 10 bis 15fachen Konzentration der Ausgangsmenge. Der Sirup löste sich in Wasser zu einer trüben, gelblich gefärbten Flüssigkeit, von der abfiltriert wurde.

Diese konzentrierte, schwach sauer reagierende klare Lösung gab folgende Reaktionen:

1. Kochen bei neutraler und schwach saurer Reaktion: Lösung bleibt völlig klar.

2. Halbsättigung sowie volle Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat läßt dieselbe völlig klar.

3. Essigsäure und Ferrocyankaliumprobe: bleibt klar.

4. Biuretreaktion: negativ.

5. Konzentrierte wässerige Sublimatlösung: keine Fällung.

6. Millons Reagens erzeugt reichliche Fällung in der Kälte; der Niederschlag löst sich unter leichter Rotfärbung beim Erhitzen; bei weiterem Erwärmen schwindet die Rotfärbung.

7. Jodquecksilberkalium und Salzsäure erzeugen eine flockige Fällung.

8. 10%ige Quecksilbersulfatlösung in schwefelsaurer Lösung: leichte flockige Fällung.

9. 10%ige Gerbsäure und Essigsäure: reichliche flockige Fällung.

10. Bromwasser: keine Rot-Violettfärbung der Flüssigkeit.

11. Reaktion nach Molisch: schöne Rot-Violettfärbung.

12. 95%iger Alkohol im Überschuß fällt einen weißen, flockigen Niederschlag.

Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge der nicht geimpften Nährlösung zur Sirupdicke eingeengt, in der gleichen Menge Wasser gelöst und dieselben Reaktionen ausgeführt: Sie blieben durchaus negativ bis auf eine Fällung mit Millons Reagens und mit 95%igem Alkohol; der Zusatz von Quecksilbersulfat in saurer Lösung erzeugte eine staubförmige Trübung.

Weitere Versuche, eine Reinigung der tuberkulinhaltigen Lösung herbeizuführen, wurden in der Weise unternommen, daß die konzentrierte wässerige Lösung im Alkoholüberschuß gefällt wurde; es ergab sich, daß die wirksame Substanz mit Alkohol niedergeschlagen wurde, während die alkoholische Lösung wirkungslos blieb.

Kurzdauernde Dialyse der konzentrierten Lösung ergab eine leichte Abschwächung der Wirksamkeit, länger dauernde Dialyse völligen Verlust.

Aus diesen Reaktionen geht hervor, daß selbst im 15fach konzentrierten Filtrat die tuberkulinhaltige Flüssigkeit sich zunächst als eiweißfrei erwiesen hat. Man muß annehmen, daß die wirksame, alkoholfällbare und dialysable Substanz weder ein Eiweißkörper im gewöhnlichen Sinne, noch eine Albumose oder ein Pepton ist. Dagegen deutet die Fällbarkeit mit Tannin und Jodquecksilberkalium auf Körper hin, die man unter den biuretfreien peptischen und tryptischen Spaltungsprodukten des Eiweißes findet und die von Fischer als Polypeptide bezeichnet worden sind. Bemerkenswert erscheint es, daß in der Kulturflüssigkeit die Kohlenhydratreaktion nach Molisch auftrat.

Für die weitere Umgrenzung der chemischen Natur des vorliegenden Körpers lag es nahe, Fermentreaktionen heranzuziehen, zumal es bereits durch Pfeiffer und seine Schüler festgestellt worden war, daß eiweißhaltiges Tuberkulin durch Verdauung mit Pepsin-Salzsäure und Trypsin-Soda vernichtet, durch Erepsin stark abgeschwächt wird.

Es war nun von großem Interesse, zu prüfen, wie sich dieses biuretfreie Tuberkulin gegenüber der Proteolyse verhalten wird. Zu diesem Zwecke wurde eine durch ein Papier-

filter geschickte Kultur, die 5 Monate lang gewachsen war und 0,5 % Carbolsäure enthielt, der Pepsin- und Trypsinverdauung ausgesetzt.

Je 8 ccm des Filtrates wurden in folgender Weise verarbeitet:

Probe I wurde versetzt mit Salzsäure bis zum Gehalte 4 ‰;
" II mit Salzsäure wie I und 0,25 g Pepsin Fairchild;
" III mit Soda bis zum Gehalte von 4 ‰;
" IV mit Soda wie III und 0,25 g Trypsin Rhenania;
" V enthielt das Kulturfiltrat ohne Zusätze;
" VI 8 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,25 g Pepsin;
" VII 8 ccm " " + 0,25 g Trypsin.

Alle Proben blieben 4 Tage im Brutschranke, wurden hierauf neutralisiert, über freier Flamme gekocht und dann mittels der intracutanen Methode an tuberkulösen Meerschweinchen ausgewertet. Das Resultat der Prüfung gibt die folgende Tabelle, wobei als positive Reaktion ein ungefähr 1 cm breites Infiltrat mit zentraler Nekrose bezeichnet wurde, während das Ausbleiben der Infiltratbildung den negativen Ausfall bedeutete:

Meerschweinchen	Nr. 343	Nr. 217	Nr. 320	Nr. 309
I 8 ccm Filtrat + 4 ‰ Salzsäure . .	positiv	positiv	positiv	positiv
II 8 " " + 4 ‰ " + 0,25 g Pepsin	negativ	negativ	negativ	negativ
III 8 ccm Filtrat + 4 ‰ Soda	positiv	positiv	positiv	positiv
IV 8 " " + 4 ‰ " + 0,25 g Trypsin	negativ	negativ	negativ	negativ
V Kontrolle 8 ccm Kochsalzlösung + 0,25 g Pepsin	"	"	"	"
VI Kontrolle 8 ccm Kochsalzlösung + 0,25 g Trypsin	"	"	"	"
VII 8 ccm Filtrat allein	positiv	positiv	positiv	positiv

Es ergibt sich, daß die 4tägige Verdauung des Tuberkulins mit Pepsin-Salzsäure und mit Trypsin-Soda zur völligen Zerstörung des wirksamen Körpers führt, während weder die gleich lange Einwirkung von Salzsäure oder Soda allein die Tuberkulinwirkung zu beeinflussen imstande ist. Es muß aus der Wirkung der proteolytischen Fermente geschlossen werden, daß die toxische Substanz durch diese Agenzien spaltbar ist und daher aller Wahrscheinlichkeit nach einen Eiweißabkömm-

ling darstellt. Die früher angeführten Reaktionen haben gezeigt, daß es sich um ein tiefstehendes Eiweißspaltungsprodukt handeln dürfte, dem die meisten charakteristischen Eiweißreaktionen fehlen. Von den uns bisher bekannten Eiweißspaltungsprodukten weisen die Polypeptide mit unserer Substanz die beste Übereinstimmung auf sowohl in bezug auf die Fällbarkeit gegenüber den benutzten Reagenzien, als auch in bezug auf ihr Verhalten zu den proteolytischen Fermenten, und wir möchten sie daher vorläufig dieser Gruppe von Körpern zuweisen; eine nähere Identifizierung mit dem Bau der Polypeptide kann allerdings erst durch weitere Isolierung und Aufspaltung des wirksamen Körpers erbracht werden, eine Aufgabe, der wir uns nach Herstellung größerer Mengen des nötigen Materials zu unterziehen gedenken.

Die Tatsache, daß ein durch proteolytische Fermente spaltbarer Eiweißabkömmling der Träger der Tuberkulinwirkung ist, steht in Übereinstimmung mit den eingangs erwähnten Untersuchungen Th. Pfeiffers und seiner Mitarbeiter über das eiweißhaltige Tuberkulin Kochs, das ebenfalls der Einwirkung von Pepsin, Trypsin und Erepsin nicht standhalten konnte. Die vorliegenden Befunde scheinen uns indes dadurch ein Interesse zu beanspruchen, weil die von uns verwendete Kulturflüssigkeit aus einfach zusammengesetzten, eiweißfreien Körpern besteht, aus denen die Bakterienzelle erst das eiweißartige Gift aufzubauen gezwungen war. Ob für den Aufbau des Tuberkulins in eiweißhaltigen Nährböden derselbe Entstehungsmodus angenommen werden soll, muß vorläufig dahingestellt bleiben. In diesem Falle müßte dem Aufbau aus den Spaltungsprodukten eine Spaltung des vorhandenen Eiweißes vorausgehen; für diese Annahme würde vielleicht sprechen, daß eine Tuberkulinwirkung in der Glycerinbouillon relativ später nachweisbar wird, als in den von uns verwendeten eiweißfreien Nährböden. Es ist aber deshalb durchaus nicht zwingend anzunehmen, daß die Zusammensetzung des Tuberkelbacillengiftes in den eiweißfreien und eiweißhaltigen Nährböden dieselbe sein und etwa das von uns beschriebene polypeptidartige Tuberkulin auch in eiweißhaltigen Nährmedien sich in gleicher Zusammensetzung vorfinden und den daselbst gelösten Eiweißkörpern bloß anhaften müsse. Es ist vielmehr

die Möglichkeit offen zu lassen, daß der Tuberkelbacillus auf eiweißhaltigen oder andersartigen, geeigneten Nährlösungen nicht nur die eiweißartigen Bestandteile seines Zelleibes aufzubauen vermag, sondern daß auch das von ihm produzierte Gift unter günstigen Bedingungen nicht auf der Polypeptidstufe seines Aufbaues stehen bleibt, sondern sich in seinem Aufbau den echten Eiweißkörpern noch weiter nähert und so unter Umständen die Pepton- und Albumosenstufe zu erreichen vermag. Es ist naheliegend, daß dieser Auffassung des Aufbaues derartiger Bakteriengifte von Antigencharakter um so mehr allgemeine Bedeutung zukommt, als wir auch bei anderen Stoffwechselprodukten der Bakterien unter Benutzung eiweißfreier Nährmedien einschlägige Beobachtungen machen konnten, über die später berichtet werden soll.

Fassen wir die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zusammen, so ergibt sich, daß es gelingt, auf eiweißfreien Nährböden ein gut wirksames Tuberkulin zu erhalten, das als echtes Stoffwechselprodukt der Tuberkelbacillen aufzufassen ist; dasselbe ist ein hitzebeständiger, dialysabler, alkoholunlöslicher Körper, der keine Biuretreaktion gibt, durch Gerbsäure, Jodquecksilberkalium und Quecksilbersulfat in saurer Lösung fällbar und durch Pepsin-Salzsäure und Trypsin-Soda zerlegbar ist.

Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Menschenblut.

Von

H. Lyttkens und J. Sandgren.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

In einer früheren Mitteilung[1]) haben wir Untersuchungen über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Kaninchenblut veröffentlicht. Im folgenden werden wir über die Verhältnisse des Menschenblutes berichten.

Unsere Versuche wurden nach derselben Methodik wie früher ausgeführt. Was wir hierbei besonders hervorheben möchten, ist, daß wir nicht wie die meisten andern Untersucher auf diesem Gebiete die Reduktion der Blutkörperchen aus der Differenz von Serum und Vollblut berechneten, sondern sowohl Körperchen wie Serum oder Plasma direkt untersuchten. Das Blut war größtenteils Placentarblut aus dem hiesigen Gebärhause, also von dem Kinde herstammend. Doch stimmten die Ergebnisse mit Blut von drei Medizinstudierenden völlig mit denen des Säuglingsblutes überein, wie auch aus der Tab. I hervorgeht, in der unsere analytischen Befunde zusammengestellt sind.

Kontrolluntersuchungen betreffs der Gärung wurden angestellt. Das Blut wurde in Oxalat ($Na_2O_4C_2$ in Substanz zirka $2^0/_{00}$) aufgefangen. Daß eine Glucolyse nicht stattgefunden hat, zeigen die Versuche 10 bis 12, wo das Blut unmittelbar nach dem Aderlaß verarbeitet wurde.

Die Tabelle (S. 154) zeigt, daß sowohl die Blutkörperchen wie das Serum reduzierende Stoffe enthalten und daß die Reduktion der Blutkörperchen (als $375^0/_{00}$ des Blutes berechnet) nicht

[1]) Lyttkens und Sandgren, diese Zeitschr. 26, 382, 1910.

viel geringer ist als die des Serums, indem die durchschnittlichen Werte 0,069 % und 0,103 % sind. Bei den Blutkörperchen sind die Differenzen von 0,037 % bis 0,111 %, beim Serum von 0,071 % bis 0,136 %. Dagegen hat sich der bemerkenswerte Unterschied herausgestellt, daß die Blutkörperchenreduktion keineswegs von einem entsprechenden Traubenzuckergehalt herrührt. Im Gegenteil enthalten die Blutkörperchen keinen oder so gut wie keinen Traubenzucker, und die ganze Glucosemenge befindet sich im Serum. Doch entspricht auch nicht die ganze Serumreduktion Traubenzucker, indem nicht weniger als 40 % der Reduktion von anderen reduzierenden Substanzen herrühren.

Tabelle I.

Versuch Nr.		Blutmenge	Blutkörperchen			Serum		
			Reduktion vor Gärung	Reduktion nach Gärung	Dextrose	Reduktion vor Gärung	Reduktion nach Gärung	Dextrose
		g	%	%	%	%	%	%
1	Placentarblut	20,7	0,050	0,040	0,010	0,083	0,042	0,041
2	"	18,9	0,089	0,074	0,015	0,127	0,048	0,079
3	"	29,8	0,090	—	—	0,071	0,045	0,026
4	"	27,3	0,046	0,041	0,005	0,107	0,053	0,054
5	"	21,8	0,061	0,061	0,000	0,087	0,040	0,047
6	"	16,4	0,075	0,079	0,000	0,136	0,035	0,101
7	"	46,4	0,037	0,035	0,002	0,071	0,031	0,040
8	"	39,9	0,080	—	—	0,114	0,049	0,065
9	"	51,9	0,111	0,094	0,017	0,092	0,038	0,054
10	cand. med. H. L-s	55,7	0,058	0,051	0,007	0,114	0,030	0,084
11	cand. med. J. F-x	65,0	0,061	0,055	0,006	0,109	0,033	0,076
12	cand. med. O. H-n	26,2	0,072	0,072	0,000	0,132	0,042	0,090
	Durchschnitt		0,069	0,060	0,006[1]	0,103	0,040	0,063

Der Gehalt des Serums an Traubenzucker ist durchschnittlich 0,06 %, scheint aber beim Säugling recht variabel. Dagegen ist der Zuckergehalt beim Erwachsenen — wenn man aus 3 Versuchen Folgerungen ziehen kann — regelmäßiger und etwas, obwohl nicht viel, höher.

Dieser wahre Zuckergehalt des Blutes verdient eine besondere Beachtung, wenn man damit den Zuckergehalt des Menschenharns vergleicht und besonders wenn man berück-

[1]) Man sollte aus der Differenz 0,009 erwarten. 0,006 entspricht aber den gefundenen Werten, da zwei Bestimmungen fehlen.

sichtigt, daß ein Teil des Blutzuckers sicher in gebundener Form (siehe unten) vorkommt. Nach Lavessons[1]) Untersuchungen ist der Zuckergehalt des Harnes durchschnittlich 0,04% (etwas geringer beim Säugling). Der normale Zuckergehalt des Harnes ist also nicht viel kleiner als der Gehalt des Blutes.

Ein nicht geringes Interesse bietet der Vergleich des Menschen- und Kaninchenblutes[2]) dar. Betrachten wir zuerst den Zuckergehalt des Serums, über den Tabelle II unterrichtet.

Tabelle II.

Menschenblut		Kaninchenblut	
Versuch Nr.	Serum Dextrose %	Versuch Nr.	Serum Dextrose %
1	0,041	9	0,208
2	0,079	10	0,194
3	0,026	11	0,276
4	0,054	13	0,210
5	0,047		
6	0,101		
7	0,040		
8	0,065		
9	0,054		
10	0,084		
11	0,076		
12	0,090		
Durchschnitt	0,063		0,222

Es hat sich also die bemerkenswerte Tatsache herausgestellt, daß der normale Zuckergehalt des Kaninchenserums (und Blutes) 3 bis 4 mal höher ist als beim Menschenblut und Serum (0,22% gegen 0,06%).

Es ist ganz klar, daß die alte, noch geläufige These Cl. Bernards über das Verhältnis zwischen Glucämie und Glucosurie keineswegs haltbar sein kann. Und besonders darf man absolut nicht die Befunde beim Kaninchen — das gewöhnlichste Versuchsobjekt — ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen.

Was beim Kaninchen das Normale ist, stellt beim Menschen eine erhebliche Hyperglykämie dar.

Gehen wir jetzt zu den übrigen reduzierenden Stoffen über; diese entsprechen beim Menschenserum durchschnittlich

---

[1]) Lavesson, diese Zeitschr. 4, 40, 1907.

[2]) Lyttkens und Sandgren, l. c.

0,04 %. Die parallelen Werte beim Kaninchen sind 0,034 %, 0,042 %, 0,032 % und 0,07 % oder im Durchschnitt 0,045 %. Die Restreduktion des Serums ist beim Menschen und Kaninchen dieselbe.

Die Restreduktion der Menschenblutkörperchen war 0,06 %. Beim Kaninchen wurde gefunden: 0,085 %, 0,041 %, < 0,071 %[1]) und 0,114 % oder durchschnittlich ca. 0,07 %. Die Restreduktion der Blutkörperchen ist auch beim Menschen und Kaninchen übereinstimmend, und für beide Blutsorten trifft auch zu, daß die Blutkörperchen keinen Traubenzucker enthalten (0,006 % bzw. 0,002 %). Den einzigen, aber wichtigen Unterschied zwischen den beiden Blutsorten stellt also der Gehalt an Traubenzucker dar.

Ebenso wie beim Kaninchenblut enthält das Menschenblut auch sog. „virtuellen“ Zucker (Lepine), der beim Kochen der Serum- bzw. Blutkörperchen bei schwach saurer Reaktion freigemacht wird. Dies findet selbstverständlich nicht beim Vollblut statt, wo nur der Alkoholextrakt verwendet wird.

Tabelle III.

Versuch Nr.		Totalreduktion v. Gärung %	Differenz %	Reduktion nach Gärung %	Differenz %
4	Vollblut Blutkörperch. + Serum	0,070 0,084	0,014	0,032 0,048	0,016
5	Vollblut Blutkörperch. + Serum	0,048 0,077	0,029	0,021 0,048	0,027

Unsere Befunde bestätigen also die alte Auffassung, daß nur das Serum Traubenzucker enthält. Sie stehen aber im Widerspruch zu den neueren Untersuchungen von Hollinger[2]), Frank[3]), Michaelis und Rona[4]) sowie Rona und Takahashi[5]).

Betreffs Hollingers und Franks Befunde ist zu bemerken, daß diese Forscher die Totalreduktion von Vollblut und Serum bestimmten; aus der Differenz wurde der „Zucker“-

[1]) Zweiter Aderlaß.

[2]) Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

[3]) Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 139, 1910.

[4]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 26, 60, 1908; 18, 375, 1909.

[5]) Rona und Takahashi, diese Zeitschr. 30, 99, 1910.

gehalt der Blutkörperchen berechnet. Die Verfasser haben also keine Rücksicht auf die übrigen reduzierenden Substanzen im Blute genommen, sondern identifizieren einfach die reduzierenden Stoffe mit Zucker. Ihre Befunde stimmen aber vorzüglich mit den unseren überein, wenn sie folgern, daß der „Zucker" im Menschenblut gleichmäßig in Serum und Körperchen verteilt sind, und man statt Zucker das richtige Wort „Totalreduktion" einführt. Wir haben ja auch gefunden, daß die Reduktion der Blutkörperchen nicht wesentlich geringer ist als die des Serums. Dasselbe haben übrigens auch Lepine und Boulud[1]) beim Hund gefunden, welche Forscher aber auch nicht den wahren Zuckergehalt festgestellt haben.

Stellt man also die Serumreduktion der Reduktion von Blutkörperchen + Serum gegenüber wie in der Tabelle IV (S. 158), so tritt die Übereinstimmung ganz unzweifelhaft hervor.

Die Totalreduktion ist also übereinstimmend; erst bei der Bestimmung der Dextrose tritt der Unterschied hervor.

Michaelis und Rona haben dagegen auch ihre Lösungen vergoren und trotzdem mit Hollinger und Frank übereinstimmende Werte gefunden. Hierbei ist die Methodik entscheidend. Michaelis und Rona bestimmten den Zucker durch Polarisation vor und nach der Gärung, wir aber nach Bangs Methode der Blutzuckerbestimmung mit kleinen für Serum und Blutkörperchen abgeänderten Modifikationen. Es fragt sich also, welches Verfahren zur Blutzuckerbestimmung das zuverlässigste ist. Die optische Methode erfreut sich keines guten Rufes.

Fränkel[2]) bemerkt z. B., daß diese Methode hier ganz unbrauchbar ist. Dies ist durchaus zutreffend. Denn 1. kann das Blut andere drehende Substanzen enthalten und weist sie tatsächlich auf, und man kann a priori nicht wissen, inwieweit diese nach der Gärung unverändert geblieben sind. 2. Wie Neuberg[3]) gefunden hat, treten bei der Gärung neue drehende Substanzen auf. 3. Schließlich muß man hierbei

---

[1]) Lepine und Boulud, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 1, 149, 583, 1909.

[2]) Sigmund Fränkel, Deskript. Biochem. Wiesbaden 1907, S. 50.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 430, 1910.

Tabelle IV.

Versuch Nr.		Totalreduktion	Dextrose
		%	%
1	Blutkörperchen + Serum	0,071	0,030
	Serum	0,083	0,041
2	Blutkörperchen + Serum	0,112	0,055
	Serum	0,127	0,079
3	Blutkörperchen + Serum	0,078	—
	Serum	0,071	0,026
4	Blutkörperchen + Serum	0,084	0,036
	Serum	0,107	0,054
5	Blutkörperchen + Serum	0,077	0,029
	Serum	0,087	0,047
6	Blutkörperchen + Serum	0,113	0,062
	Serum	0,136	0,101
7	Blutkörperchen + Serum	0,060	0,028
	Serum	0,071	0,040
8	Blutkörperchen + Serum	0,101	—
	Serum	0,114	0,065
9	Blutkörperchen + Serum	0,099	0,040
	Serum	0,092	0,054
10	Blutkörperchen + Serum	0,093	0,055
	Serum	0,114	0,084
11	Blutkörperchen + Serum	0,091	0,050
	Serum	0,109	0,076
12	Blutkörperchen + Serum	0,109	0,056
	Serum	0,132	0,090
Durchschnitt:	Blutkörperchen + Serum	0,091	0,046
	Serum	0,103	0,063

besonders berücksichtigen, daß der abgelesene Drehungswinkel bei dem geringen Zuckergehalt nur sehr gering ist. Rona und Takahashi geben von + 0,2° bis + 0,5° an. Sie erklären zwar, daß der mittlere Fehler nur ± 0,01° beträgt. Früher haben aber Michaelis und Rona[1]) denselben Fehler zu „höchstens 0,05°" oder durchschnittlich bis ± 0,025° angegeben. Der Ablesungsfehler kann also bis 20% ansteigen! Wenn man hierzu den durch die Gärung selbst bedingten Polarisationsfehler addiert, kann man sehr wohl die unrichtigen Versuchsergebnisse dieser Forscher verstehen.

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 14, 480, 1908.

Zur Theorie der Enzymwirkung.

Von

Oscar Loew.

(Eingegangen am 21. Januar 1911.)

Es ist bekannt, daß die Lösungen der Enzyme durch Erwärmen auf 60 bis 80°, sowie durch verdünnte Säuren und Alkalien so leicht ihre Wirksamkeit verlieren, daß nur der Schluß übrig bleibt auf das Vorhandensein von labilen Atomgruppen, die durch Umlagerungen leicht verändert werden. Chemische Labilität und chemische Arbeit hängen somit aufs engste zusammen. Da man die chemische Arbeit der Enzyme durch Erhöhung der Temperatur bis nahe zur Tötungsgrenze (Umlagerungsmoment) steigern kann, so kann nicht anders geschlossen werden, als daß hier die thermische Energie chemische Arbeit geleistet hat. Da aber getötete Enzyme hierzu unfähig sind, so ist weiter zu schließen, daß nur die labilen Atome jene Leistung vermittelten, indem dieselben thermische erst in chemische Energie umwandeln, bevor die Arbeit geleistet wird. Diese Umwandlung geht hier so leicht vonstatten, wie die des elektrischen Stromes in Licht. Ich habe deshalb schon früher den Satz ausgesprochen,[1] daß labile Atomgruppen befähigt sind, schon bei relativ niederer Temperatur thermische in chemische Energie umzuwandeln. Die thermische Energie kann hierbei entweder durch die Respiration der Zellen oder durch das Wärmereservoir unserer Atmosphäre oder durch eine künstliche Wärmequelle geliefert werden.

Ich meinte, daß meine Ausführungen für jeden, der in der theoretischen organischen Chemie etwas bewandert ist, leicht

[1] Physikalisch-chem. Centralbl. 5, 609. Siehe auch Pflügers Archiv 1904, 96.

verständlich gewesen wären und war deshalb nicht wenig überrascht, als in der kürzlich erschienenen 3. Auflage des Werkes von Prof. Carl Oppenheimer folgende merkwürdigen Sätze[1]) in bezug auf obige Darlegung erschienen.

„Die Fermente sind danach sehr labile Substanzen, die sich sozusagen explosionsartig zersetzen und dadurch Bewegungen übertragen. In einer neueren Arbeit glaubt Loew, daß es sich nicht um Aldehyde, sondern um Ketone handelt, was er und Aso dadurch zu stützen trachten, daß Hydrazin usw. giftig auf Enzyme wirken. Diese Dinge sind aber rein spekulativ, wenn auch die Grundannahme, daß die Fermente labile Gruppen enthalten, nicht von der Hand zu weisen ist.“

Der Schreiber dieser Sätze, Herr Prof. Herzog, hat sich vielleicht nicht die Mühe genommen, meine Darlegungen wirklich verstehen zu wollen, sonst hätte er unmöglich von Explosion und Spekulation reden können. Bei der Wichtigkeit der Sache und der großen Verbreitung jenes sonst so gründlichen Werkes bin ich gezwungen, meine Anschauungen in leicht verständlicher Form nochmals zusammenzufassen.

Es wird hier vor allem nötig, den Begriff der chemischen Labilität zu definieren. Es genügt nicht, labile Atomgruppen schlechtweg als „leichtveränderliche“ zu definieren, denn es ergibt sich bei näherer Betrachtung bald, daß zweierlei grundverschiedene Arten von chemischer Labilität zu unterscheiden sind, worauf ich schon vor Jahren hingewiesen habe.[2]) Ich unterschied dieselben als potentiell-labil und kinetisch-labil oder als statisch und dynamisch, je nachdem die zur Äußerung kommende chemische Energie bloß aufgespeichert ist oder in kontinuierlich tätiger Form ausgeübt wird. Bei jener Form von Labilität kann die aufgespeicherte chemische Energie[3]) durch geringfügige Ursachen plötzlich kinetisch werden, wobei eine so heftige Neulagerung der Atome stattfindet, daß eine Explosionserscheinung eintritt, wie bei Nitroglycerin, Acethylenkupfer, Knallquecksilber, Diazotetrazotsäure und anderen Diazo-

---

[1]) Allgemeiner Teil S. 26 und 27.

[2]) So in der ersten Auflage meiner Schrift: Die chemische Energie der lebenden Zellen. München 1899, S. 135.

[3]) Selbstverständlich ist diese intramolekular aufgestapelte chemische Energie verschieden von der erst durch Vereinigung mit Sauerstoff bei der Verbrennung freiwerdenden sog. „Sonnenenergie“ der organischen Substanzen.

körpern, organischen Peroxyden und Ozoniden. Von der ursprünglichen Struktur der Moleküle bleibt hier gar nichts mehr erhalten, und die freiwerdende chemische Energie äußert sich zum Teil in Form von thermischen und mechanischen Effekten.

Eine kontinuierliche Energieäußerung wäre hier nur möglich, wenn die Explosionen in gewissen kleinen Zeiträumen nacheinander stattfinden würden wie bei dem Gasmotor. Es ist klar, daß hier die Energieleistung von einer stetigen Substanzzertrümmerung begleitet ist, und nur eine große Kurzsichtigkeit könnte deshalb die Enzymwirkung mit einer solchen Art von Energieäußerung vergleichen, denn die Enzyme bleiben ja bei ihrer Arbeitsleistung völlig unverändert.

Herzog tut mir sehr unrecht, wenn er mir solche Ansichten zuschreibt, denn ich habe im Gegenteil stets die Anwendung der Explosionshypothese auf die Äußerungen lebender Zellen oder Enzyme bekämpft.[1]) Wenn man die Enzymwirkung überhaupt mit einer Maschinentätigkeit vergleichen will, so paßt am besten der Vergleich mit einem Heißluftmotor, durch welchen zugeführte Wärme direkt in mechanische Arbeit umgewandelt wird, während bei den Enzymen die Wärme durch labile Gruppen chemische Arbeit leistet.

Es kann sich bei den Enzymen nur um eine kinetische Labilität handeln.

Seit lange weiß man, daß gewisse Atomgruppen leichter reagieren als andere, daß gewisse Wasserstoffatome z. B. leichter substituierbar sind als andere in demselben Molekül; man weiß, daß gewisse Stoffe sich leicht an der Luft von selbst oxydieren, andere, chemisch sogar sehr nahestehende aber nicht. Es ist bekannt, daß manche Stoffe sich sehr leicht kondensieren, andere sich polymerisieren. Alle diese Zustände belegt man mit dem Worte „chemische Labilität". Aber es ist eine andere Art als die oben geschilderte, denn die Veränderungen führen niemals zu einer Zertrümmerung des Moleküls unter Auslösung potentieller Energie. Die Struktur bleibt im Gegenteil oft bis zu gewissem

[1]) So heißt es z. B. in der ersten Auflage meiner oben zitierten Schrift S. 150: „Der Leser wird sich indessen schon überzeugt haben, daß jener Vergleich — mit einer Explosion — gar nicht paßt." Siehe auch zweite Auflage, S. 119, wo der Vergleich der aktiven Proteine in der lebenden Zelle mit einer explosiven Substanz verworfen wird.

Grade erhalten, ja manchmal ist das Umwandlungsprodukt sogar leicht wieder in die ursprüngliche Verbindung zurückzuführen. Diese kinetische Labilität ist bedingt durch ein vergrößertes Schwingungsvolumen und dieses wieder dadurch, daß zwei oder mehrere benachbarte Atome zugleich auf ein und dasselbe Atom einwirken.[1]) Infolgedessen kann das in größeren Schwingungen befindliche labile Atom leichter Affinitäten nach außen entwickeln, es wird leichter substituierbar oder oxydierbar, es kann zu Kondensationen führen. Wird dann ein solcher Vorgang ausgelöst, so tritt im Moment der Reaktion Wärme auf, die chemische Energie des labilen Atoms ist verschwunden und damit das große Schwingungsvolumen; es hat mit dem Verlust der chemischen Energie in Form von Wärme zugleich eine molekulare Kontraktion stattgefunden.

Das Schwingungsvolumen des für Aldehyde und Ketone charakteristischen Carbonylsauerstoffatoms wurde zu 12,2 bestimmt, gegenüber dem von 7,8 für das Hydroxylsauerstoffatom. Es kann also daraus geschlossen werden, daß der chemischen Energie eine größere Schwingungsamplitude und Schwingungsdauer zukommt als der thermischen; denn die stabilen Atome in einer Verbindung unterliegen ja bei gewöhnlicher Temperatur nur der umgebenden thermischen Energiebewegung.[2]) Das

---

[1]) Man kann sich davon z. B. ein Bild machen, wenn man einem aufgehängten eisernen Gegenstand von passender Form einen oder zwei Magneten nähert.

[2]) Ich habe schon vor nahezu 30 Jahren den Zusammenhang zwischen dynamischer Labilität mit Energieleistung betont. So heißt es in Pflügers Archiv 22, 510 in einer Anmerkung: „Es scheint mir, daß die Schwingungen in der Aldehydgruppe durch die Nähe von Amidogruppen gesteigert werden, wodurch dann die Leistungen der ungeformten Fermente noch besser verständlich würden.“ In der Schrift: Die chemische Kraftquelle im lebenden Protoplasma, München 1882, S. 20, heißt es: „Wir wissen, daß mit der Steigerung der inneren Bewegung durch Wärmezufuhr, bei einem organischen Körper auch seine Zersetzlichkeit, seine Neigung, mit anderen Körpern sich zu verbinden, wächst. Umgekehrt dürfen wir schließen, daß solche Körper, die wie die Aldehyde schon bei gewöhnlicher Temperatur leicht reagieren, eine bedeutende Bewegung gewisser Atomgruppen besitzen.“ Nägelis Theorie der Fermentwirkungen nimmt zwar gewisse Schwingungen an, die von Enzymen ausgehen — aber jede Begründung, wie diese Schwingungen zustande kommen sollen, fehlte noch.

Schwingungsvolumen des Stickstoffatoms in der Cyangruppe ist ca. 7 mal so groß als das des Stickstoffatoms in der Amidogruppe, dementsprechend sind auch Cyangruppen sehr labiler Natur, wie bei Nitrilen und der Cyansäure zutage tritt. Aber nicht nur die Bestimmungen des Schwingungsvolumens, sondern auch die Verbrennungswärme kann zum Verständnis der Energie labiler Gruppen herangezogen werden.

Sehr richtig schließt Stohmann, wenn er sagt: „Die Gesamtverbrennungswärme organischer Verbindungen besteht aus zwei Teilen; der größere Anteil wird bestimmt durch die Zahl und Art der Atome, der andere, kleinere, durch die Stellung der Atome im Molekül; letztere ist es, die in enger Beziehung zum Molekularvolumen, Schmelz- und Siedepunkt, Lichtbrechungsvermögen und dem Grade der Beständigkeit steht."

Als besonders interessante Fälle von chemischer Labilität seien folgende erwähnt: Amidoäthylaldehyd (E. Fischer) und Diamidoaceton (Rügheimer und Mieschel) erleiden bald nach ihrer Darstellung eine Veränderung, ebenso Chinondiimid (Willstätter) und Imidodihydroxamsäure (Bamberger). Große Neigung zu spontaner Polymerisation besitzen die Dialdehyde von Korksäure, Glutarsäure und Bernsteinsäure, sowie die labile Form von Cyclooctadien (Willstätter). Große Reagierfähigkeit ist dem Fulven (Thiele), den Ketenen (Staudinger) und dem Monobromacetylen eigen. Orthoaminobenzaldehyd (P. Friedländer) erleidet leicht Umlagerung.

Nach Claisen existieren in der Benzolreihe 1,3 Diketone in zwei verschiedenen Formen. Es hängt von der Natur der eingetretenen Radikale, der Temperatur und der Natur des Lösungsmittels ab, welche Form die beständigere ist. Ähnliches gilt für die tautomeren Formen des Diacetbernsteinsäureesters (Knorr), des Phenylformylessigesters von Wislicenus und des Acetessigesters. Geht die Keto- in die Enolform über, so handelt es sich um eine bedeutende Wanderung eines Wasserstoffatoms, wobei der Ketonsauerstoff durch Übergang in Hydroxyl sein großes Schwingungsvolum verliert, während durch die entstehende doppelte Bindung zwischen den zwei Kohlenstoffatomen der in Reaktion tretenden Atomgruppen eine Vergrößerung des Schwingungsvolumens dieser Kohlenstoffatome stattfindet. So wechselt hier Kontraktion mit Expansion, sobald das labile Wasserstoffatom seine Stelle wechselt. Wir haben

hier ein Spiel von Bewegungserscheinungen, das durch chemische Energie bedingt und durch die thermische Energie der Umgebung unterhalten wird.

Es ist in dieser Beziehung von besonderem Interesse, daß, wie Kaufmann[1]) gefunden hat, Carbonylgruppen in Ketonen und Aldehyden zur Umwandlung von Energie auch in anderer Beziehung sich eignen, nämlich zur Umwandlung von Teslaströmen in Licht.

Wenn nun ein Stoff A mit labilen Atomen mit Molekülen eines anderen Stoffes B in innige Berührung kommt, deren Atome nicht schwer in Bewegung zu setzen sind, so kann entweder eine Reaktion zwischen beiden Stoffen eintreten und eine Verbindung sich bilden, oder die Übertragung der chemischen Energie von A auf die Atome von B kann in B selbst eine Veränderung erzeugen, während A unverändert bleibt. Ein solcher Fall liegt z. B. vor, wenn Cyangas in eine wässerige Lösung von Äthylaldehyd geleitet wird. Liebig hat hierbei die Bildung von Oxamid aus Cyan beobachtet, wobei der Äthylaldehyd nicht in Reaktion trat. Es liegt also hier eine Katalyse durch chemische Energie vor, ein Analogon zur Katalyse durch Lichtwirkung.

Behufs Übertragung von Energie ist noch die innigste Berührung ein Erfordernis. Daß dieselbe z. B. durch eine spezifische Konfiguration erreicht werden kann, geht aus einer Beobachtung E. Fischers an α- und β-Methylglucosid hervor.

Wie kann man nun die Natur von labilen Atomgruppen ergründen? Die organische Chemie kennt eine große Anzahl von charakteristischen Reaktionen behufs Erkennung von bestimmten Atomgruppierungen. Um die Carbonylgruppe zu erkennen, wendet man z. B. Phenylhydrazin an, wodurch sehr leicht ein sog. Phenylhydrazon gebildet wird. Im allgemeinen reagieren Hydrazin und Hydroxylamin sehr leicht mit Aldehyden und Ketonen, wobei unter Verlust der charakteristischen Eigenschaften Hydrazone resp. Oxime entstehen.

Wenn man nun Hydrazin oder Hydroxylamin bei gewöhnlicher Temperatur und in völlig neutraler Lösung mit Enzymen in Berührung läßt, so findet eine Einwirkung statt;

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33 und 35.

denn die Enzyme verlieren ihre charakteristische Eigenschaft, ihre Aktivität. Soll man nun Halt machen und die Logik begraben — oder soll man den Schleier wegreißen und den einzig zulässigen Schluß ziehen auf die Anwesenheit von Carbonylgruppen in den Enzymen und deren Beteiligung bei der Aktionsfähigkeit der Enzyme?

Ich hatte schon früher, im Jahre 1888, von der Vermutung ausgehend, daß es sich bei der Labilität der Enzyme um das gleichzeitige Vorhandensein von Aldehyd- und Amidogruppen handle, verdünnte neutrale Lösungen von freiem Hydroxylamin auf Diastase wirken lassen und gefunden, daß diese hierbei nach 24 Stunden Stehen unwirksam wurde.[1]) Später konstatierte ich die gleiche Erscheinung bei Katalase.[2]) Aso[3]), der auf meinen Vorschlag solche Studien fortsetzte, beobachtete: Hydroxylamin tötet in 1 %iger neutralisierter Lösung bei 40° in 4 Stunden Pepsin, Trypsin und Diastase. Hydrazin tötet bei 40° in 2 Stunden ebenfalls dieselben Enzyme, während die Wirksamkeit von Emulsin erst in 8 Stunden bis auf Spuren vernichtet ist. Methylhydrazin tötet bei 40° in 4 Stunden Pepsin, Trypsin und Diastase völlig ab.

Wroblewsky[4]) fand, daß Zymaselösung auf Zusatz von 1,3 % freien Hydroxylamins unwirksam wird.

Da ich nun keine Metallreduktion aus hochverdünnter, schwach alkalischer Silberlösung bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß durch Enzyme beobachten konnte, schloß ich, daß die mit Hydroxylamin und Hydrazin reagierenden Carbonyle mehr auf Ketonnatur als auf Aldehydnatur der Enzyme deuten.[5])

Um zu beobachten, ob Amidogruppen sich bei dem Zustandekommen des hohen Labilitätsgrades resp. der Arbeitsleistung der Enzyme beteiligen, ließ ich i. J. 1888 Formaldehyd, von dem wir wissen, daß er mit Amidogruppen leicht reagiert

---

[1]) Journ. prakt. Chem. 37, 104.

[2]) Catalase, a new enzyme of general occurrence, S. 29. U. S. Dept. of Agriculture, Washington 1901.

[3]) Bulletin, College of Agriculture, Tokyo, 6, 1905. Leider gelang es nicht, die Einwirkungsprodukte in krystallisierter Form zu gewinnen.

[4]) Centralbl. f. Physiol. 1898, Heft 12.

[5]) Manche Amidoketone reduzieren zwar auch, aber wie es scheint nicht bei sehr hoher Verdünnung der Silberlösung.

in 0,5%iger neutraler Lösung auf Enzyme wirken und beobachtete ein baldiges Unwirksamwerden von Pepsin und Diastase. Papayotin, Trypsin und Emulsin lieferten mit Formaldehyd ganz unwirksame Niederschläge. Katalaselösung wird in 1 Stunde durch Zusatz von 4% Formaldehyd unwirksam. Seither haben andere Autoren ähnliche Beobachtungen gemacht, Bokorny an Myrosin, Chymosin und Diastase, Pottevin an Invertase, Vines an Papain, Wroblewsky an Zymase.

Ein charakteristisches Reagens auf Amidogruppen ist salpetrige Säure, die damit entweder unter Bildung von hydroxylierten oder diazotierten Körpern reagiert. Je labiler die Wasserstoffatome in der Amidogruppe, desto leichter wird diese zerstört. Nun hat Wroblewsky (l. c.) beobachtet, daß Hefepreßsaft auf Zusatz von 0,5% salpetrigsauren Natrons bald die Wirksamkeit auf Glucose einbüßt. Aso (l. c.) hat sehr verdünnte Lösungen von Natriumnitrit und Natriumnitrat (zur Kontrolle) mit der berechneten Menge titrierter verdünnter Schwefelsäure versetzt und auf Enzyme wirken lassen, wobei sich ergab, daß die salpetrige Säure auf Pepsin, Trypsin und Emulsin viel schädlicher wirkte als die an Acidität stärkere Salpetersäure. Pepsin wurde bei 40° durch 2%ige salpetrige Säure in 1 Stunde, Trypsin durch 0,05%ige in 1 Stunde, Emulsin bei 18° in 16 Stunden durch eine 0,5%ige getötet. Es kommt hier also nicht die Acidität an sich in Betracht, die lediglich eine Umlagerung bewirkt hätte, bei der die Natur der sich umlagernden Gruppen nicht zutage treten kann, sondern es mußte jene spezifische Wirkung der salpetrigen Säure eingetreten sein. Anders liegt der Fall bei Diastase, die gegen Mineralsäuren überhaupt selbst bei großer Verdünnung sehr empfindlich ist; deshalb war kein eindeutiges Resultat zu erwarten.[1])

Diese sämtlichen hier erwähnten Tatsachen, die zur chemischen Charakterisierung von Enzymen gehören, werden nun in allen Werken über Enzyme einfach totgeschwiegen.

Eine interessante Analogie mit manchen Fermentwirkungen hat Neuberg[2]) bei Studien über Photokatalyse in Gegenwart von Eisensalzen und anderen Metallverbindungen beobachtet.

[1]) Weiteres siehe Pflügers Archiv 102, 106 bis 109, 1905,

[2]) Diese Zeitschr. 27, 271, 1910 und 29, 279, 1910.

„Molekularverkleinerung und Bildung von reaktionsfähigen Carbonylverbindungen“ hat sich als das gemeinsame Charakteristikum dieser Lichtwirkungen erwiesen. Hier sind es die Lichtschwingungen, die in chemische Energie verwandelt werden, bei den Enzymen sind es die Wärmeschwingungen.

In neuerer Zeit hat auch Rosenthal[1]) die Ansicht vertreten, daß „den Enzymen eine gewisse kinetische Energie innewohnt, die sie auf andere Körper übertragen und dadurch deren Zerfall herbeiführen“. Es gelang ihm, dieses durch einen Versuch sehr wahrscheinlich zu machen, bei dem Polysaccharide, Glucoside und Proteine durch Einführung in Solenoide, die von sckwankenden elektrischen Strömen durchflossen wurden, in ähnlicher Weise zerlegt wurden wie durch Enzyme.[2]) Er berührt auch die Frage nach der Spezifität der Enzyme — allein hier betritt man den Boden der Spekulation.

[1]) Sitzungsber. d. physikal.-mediz. Sozietät in Erlangen, 39, 557.

[2]) Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. 1908. Quantitative Daten wären hier erwünscht, ferner Angaben über Säurebildung usw.

Weitere Bemerkungen über den Zusammenhang zwischen Oxydationsgröße und Cytolyse der Seeigeleier.

Von

Jacques Loeb und Hardolph Wasteneys.

(Aus dem Rockefeller Institut, New York.)

(Eingegangen am 1. Januar 1911.)

Zwei Notizen, die O. Warburg vor kurzem in dieser Zeitschrift und in der Zeitschrift für physiol. Chem. veröffentlicht hat,[1]) haben ein Mißverständnis (für das wohl die Kürze unserer Darstellung verantwortlich ist) zur Voraussetzung, das wir aber korrigieren möchten, da es sonst leicht zu weiteren Mißverständnissen Veranlassung geben könnte. Er nimmt nämlich an, daß die Eier von Arbacia nicht, wie es tatsächlich der Fall ist, alle in einer reinen Chlornatriumlösung der Cytolyse verfallen, sondern nur 20°/₀ derselben; und er schließt deshalb, daß Wasteneys und ich seine „Erklärung der Cytolyse durch Messungen an Organismen widerlegen, die nicht cytolysieren und für die das von ihm bearbeitete Problem nicht existiert".

Wir vermuten, daß das Mißverständnis von Warburg durch folgenden Passus in unserer Arbeit[2]) veranlaßt war. „Wenn man Arbaciaeier 1 Stunde lang in eine Chlornatriumlösung bringt, so gehen meist nicht mehr als 20°/₀ der Eier an Cytolyse zugrunde, während die übrigen 80°/₀ sich, wenn man sie in normales Seewasser zurückbringt, zu schwimmenden Larven entwickeln." Wir hätten hier zufügen sollen, daß, wenn die Eier nicht nach 1 Stunde aus der reinen Chlornatriumlösung genommen werden, sie alle der Cytolyse ver-

[1]) Diese Zeitschr. 29, 414; Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 496.

[2]) Diese Zeitschr. 28, 340.

fallen.[1]) Die Cytolyse ist ein Vorgang, der Zeit erfordert und nicht bei allen Eiern gleichzeitig eintritt.

Wir haben also die Oxydationsvorgänge bei Eiern gemessen, die alle unter dem Einflusse der Chlornatriumlösung der Cytolyse verfallen, aber den Versuch beendet, als erst 20⁰/₀ der Eier zerstört waren. Wäre die Zerstörung der Eier in einer reinen Chlornatriumlösung durch eine erhebliche Erhöhung der Oxydationen (auf das 5fache) bedingt, wie Warburg annimmt, so hätte sich das doch wohl in einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches in unseren Versuchen zeigen sollen.

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 29, 80, 1910.

Nachtrag zu der Arbeit von H. Klein:

Über die Resorption von Cholesterinestern.

Von

A. Magnus-Levy.

(Diese Zeitschr. 29, 465.)

In der obigen Arbeit ist Bezug genommen worden auf einen Schluß, den Fraiser und Gardner aus Hämolyseversuchen nach Cholesterinfütterung auf die Form des Cholesterins im Blutserum ziehen, zugleich mit der Bemerkung und Begründung, daß mir dieser Schluß nicht bündig schiene. (Auf die Tatsache der Festigung gegen Hämolyse wurde dabei nicht eingegangen, da sie mit der Arbeit von Klein nicht in Beziehungen stand.) Auf Wunsch von Herrn Dr. Pribram trage ich hiermit nach, daß er den gleichen Versuch schon vor den englischen Autoren ausgeführt und den gleichen Schluß gezogen hat.[1])

[1]) Diese Zeitschr. 1, 414, 1906.

Über zuckerfreie Hefegärungen. I.

Von

C. Neuberg und A. Hildesheimer.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiolog. Instituts der Kgl. Landw. Hochschule zu Berlin.)

Vor kurzem haben Neuberg und Wastenson mitgeteilt[1]), daß bei der Einwirkung von Hydroperoxyd und Eisensalzen auf Aceton eine eigentümliche Oxydation des Acetons eintritt; aus den Reaktionsprodukten konnte mit p-Nitrophenylhydrazin das entsprechende Osazon des Methylglyoxals isoliert werden. Die Bildung desselben ist vielleicht im Sinne folgender Formeln zu deuten:

α) $CH_3 \cdot CO \cdot CH_3 \longrightarrow CH_3 \cdot C(OH):CH_2$

β) $CH_3 \cdot C(OH):CH_2 + H_2O_2 = CH_3 \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH$

γ) $CH_3 \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH$

δ) $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH + O = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot CHO$.

Ferner hat sich herausgestellt, daß nach Abdestillieren der flüchtigen Produkte aus der zuvor neutralisierten Lösung noch eine stark reduzierende Substanz zurückblieb.

Es lag im Bereiche der Möglichkeit, daß durch Wiederholung des angegebenen Reaktionsmechanismus aus intermediär gebildetem Brenztraubenalkohol (Acetol) das kaum flüchtige Dioxyaceton entstanden wäre:

ε) $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH \longrightarrow CH_2:C(OH) \cdot CH_2OH$

ζ) $CH_2:C(OH) \cdot CH_2OH + H_2O_2 = CH_2OH \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH$

η) $CH_2OH \cdot C(OH)_2 \cdot CH_2OH = H_2O + CH_2OH \cdot CO \cdot CH_2OH$.

Zur Prüfung dieser Annahme wurden Gärungsproben angestellt, da ja nach den Ergebnissen von G. Bertrand[2]), P. Boysen-Jensen[3]) sowie E. Buchner und J. Meisenheimer[4]) das Dioxyaceton gärbar ist.

---

[1]) Sitzung d. Berl. Physiol. Ges. vom 20. Januar 1911.
[2]) G. Bertrand, Annal. de Chem. et de Phys. [8], 3, 181, 1904.
[3]) P. Boysen-Jensen, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 666, 1908.
[4]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1773, 1910.

Tatsächlich fielen die Gärproben positiv aus, ohne daß es jedoch gelang, Dioxyaceton in Form des leicht erhältlichen Glycerosazons oder auf andere Art nachzuweisen; auch etwa durch Kondensation von Dioxyaceton gebildete Hexosen wurden gleichfalls nicht aufgefunden und konnten deshalb nicht für das Gärungsvermögen der Acetonoxydationsprodukte verantwortlich gemacht werden.

Diese Beobachtungen im Verein mit dem Befunde, daß ein Teil der reduzierenden, aus neutraler Lösung nicht flüchtigen Oxydationsprodukte des Acetons aus Brenztraubensäure[1]) bestand, gab uns Veranlassung, verschiedene Substanzen aus der 3-Kohlenstoffreihe bezüglich ihres Verhaltens zu Hefe zu prüfen.

Der Brenztraubenaldehyd (Methylglyoxal) $CH_3 \cdot CO \cdot COH$ ist von E. Buchner und J. Meisenheimer[2]) als unvergärbar durch Hefepreßsaft, von P. Mayer[3]) und A. Wohl[4]) als unangreifbar durch lebende Hefe erkannt. Darum ist die bestechende Ansicht, daß Methylglyoxal ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung sei [A. Wohl[4]), A. Windaus und F. Knoop sowie E. Erlenmeyer jun.] von Buchner und Meisenheimer[5]) verlassen.

Es ist nun zu bedenken, daß nach den grundlegenden Befunden von Battelli und Stern[6]) sowie von Parnas[7]) einfache Aldehyde in Berührung mit lebenden Zellen unbeständig sind und im Sinne der Cannizaroschen Reaktion zu dem entsprechenden primären Alkohol und dessen Säure unter Aufnahme von 1 mol. H_2O umgelagert worden:

$$\begin{matrix} R \cdot COH + H_2 \\ + \quad\quad | \\ R \cdot COH \quad\; O \end{matrix} = \begin{matrix} R \cdot CH_2OH \\ + \\ R \cdot COOH. \end{matrix}$$

---

[1]) Dieselbe entsteht wohl aus dem Methylglyoxal oder Acetol durch weitere Oxydation.

ϑ) $CH_3 \cdot CO \cdot COH \quad + O = CH_3 \cdot CO \cdot COOH$

ι) $CH_3 \cdot CO \cdot CH_2OH + O_2 = H_2O + CH_3 \cdot CO \cdot COOH$.

[2]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 3202, 1906.

[3]) P. Mayer, diese Zeitschr. 2, 435, 1906.

[4]) A. Wohl, diese Zeitschr. 5, 45, 1907.

[5]) Siehe Fußnote 4 Seite 170.

[6]) F. Battelli und L. Stern, Bull. de la Soc. biolog. 1910, Mai; diese Zeitschr. 28, 145, 1910.

[7]) J. Parnas, diese Zeitschr. 28, 274, 1910.

Im Sinne dieser Erfahrungen ergibt sich die Forderung, zu prüfen, wie sich die Umlagerungsprodukte des Methylglyoxals nach Cannizaro:

$$\begin{matrix} CH_3\cdot CO\cdot COH & & H_2 & & CH_3\cdot CO\cdot CH_2OH \\ + & + & | & = & \\ CH_3\cdot CO\cdot COH & & O & & CH_3\cdot CO\cdot COOH, \end{matrix}$$

d. i. Brenztraubenalkohol und Brenztraubensäure, zur Hefe verhalten. Zunächst wurde die leicht in reinem Zustande erhältliche Brenztraubensäure geprüft. Sie ergab in gewisser Hinsicht sofort ein positives Resultat. Sie liefert nämlich, in Form löslicher Salze verwendet, in den üblichen Gärungsröhrchen reichlich Kohlendioxyd.

Das Nähere ergeben folgende Versuchsprotokolle.

Benutzt wurden die gewöhnlichen Gärungsröhrchen nach Schrötter, mit 10 bis 11 ccm Inhalt des langen Schenkels. Temperatur in der Regel 36°. Hefemenge 1 bis 2 g auf 15 ccm der Lösung.

Versuch 1.

3%ige wässerige Lösung der Brenztraubensäure; innerhalb 24 Stunden keine CO_2-Entwicklung.

Versuch 2.

1%ige wässerige Brenztraubensäurelösung; in 36 Stunden keine Gärung.

Versuch 3.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Ammoniak; innerhalb 24 Stunden 8 ccm CO_2.

Versuch 4.

6%ige Lösung von brenztraubensaurem Ammoniak; nach 24 Stunden ca. 7 ccm CO_2.

Versuch 5.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; nach 24 Stunden 10 ccm CO_2.

Versuch 6.

4%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; nach 22 Stunden 9 ccm CO_2.

Versuch 7.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Calcium[1]); nach 24 Stunden ca. 7 ccm CO_2.

---

[1]) 5%ige Lösung der freien Säure mit $CaCO_3$ bei 40° bis zur neutralen Reaktion geschüttelt und filtriert.

Versuch 8.

3 %ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium lieferte bei 15° nach 20 Stunden ca. 1 ccm CO_2; nach 6stündigem Verweilen der Probe im Brutschrank bei 36° rund 7 ccm CO_2.

Versuch 9.

5 %ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium ergab bei 33° innerhalb 6 Stunden etwa 1,5 ccm CO_2, nach 24 Stunden 9 ccm, nach 40 Stunden 11 ccm CO_2.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die freie Brenztraubensäure nicht, wohl aber ihre löslichen Alkali- und Erdalkalisalze mit Hefe „gären".

Die nach dem Ausfall der ersten Versuche anfänglich gehegte Vermutung, daß nur das Ammonsalz von der Hefe angreifbar sei, hat sich nicht bestätigt. Die Gegenwart von Stickstoff in Form des Ammonsalzes ist keineswegs erforderlich.

Deutlich ist eine gewisse Inkubationszeit erkennbar. Erst nach 8 bis 10 Stunden setzt kräftige Kohlensäureentwicklung ein.

Diese Verhältnisse illustriert übersichtlich

Versuch 10.

Derselbe ist mit der 5 %igen Lösung des Kaliumsalzes in einem registrierenden Gärungsapparat angestellt, der von den Herren W. Caspari und R. von der Heide konstruiert ist.[1]) Es ergab sich, daß hierbei nach 6 Stunden 0,5 ccm, nach 12 Stunden 1,5 ccm, nach 24 Stunden 4 ccm und nach 46 Stunden 8 ccm CO_2 entwickelt waren. (Temperatur 28 bis 32°.)

Das von der Hefe aus brenztraubensauren Salzen erzeugte Gas ist scharf als Kohlendioxyd erkannt; es wird praktisch restlos von Kali- oder Natronlauge absorbiert.

So einfach die Feststellung des gasfömigen Gärungsproduktes ist, so wenig geklärt ist die Natur des oder der übrigen Gärungserzeugnisse. Bisher haben wir Äthylalkohol nicht nachweisen können.

Nach 24 Stunden ist im Gärgut Brenztraubensäure mit der Phenylhydrazinreaktion nach E. Fischer[2]) sowie mit der Nitroprussidnatriumprobe noch erkennbar. Nach 48 Stunden ist die Brenztraubensäure aber mehr oder minder vollständig verschwunden, wenn man einen erheblichen Hefenüberschuß

[1]) Sitzung der Berl. Physiol. Ges. vom 20. Januar 1911.

[2]) E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 17, 578, 1884.

angewandt hat. Die Reaktion ist nach den Vergärungen sauer, neutral oder auch schwach alkalisch befunden worden.

Bei dem

Versuch 11

mit 10 g Brenztraubensäure (als Ammonsalz) in 250 ccm Leitungswasser und 5 g Hefe wurde nach 54 Stunden die schwach sauer reagierende Flüssigkeit von der zu Boden gesunkenen Hefe abfiltriert und mit KOH alkalisch gemacht. Nachdem so ein Übergang von Spuren etwa noch vorhandener Brenztraubensäure verhindert war, wurde destilliert, und nach nochmaliger Zugabe von ca. 50 ccm H_2O wurden 100 ccm übergetrieben. Diese reagierten dank einem Gehalt an Ammoniak alkalisch und wurden deshalb nach Zusatz von verd. H_2SO_4 bis zur sauren Reaktion abermals überdestilliert. Selbst die ersten Tropfen des Destillates enthielten keine nachweisbare Menge Alkohol. (Kaliumbichromatprobe.)

Das Destillat zeigte folgende Reaktionen:

a) Liebensche Jodoformprobe war momentan positiv.

b) Gunningsche Jodoformreaktion positiv.

c) Ammoniakalische Silberlösung wird schwach, auf Zusatz von fixem Alkali sehr stark reduziert.

d) Mit Fehlingscher Mischung erfolgt geringe Reduktion bei gelindem Erwärmen, kräftige beim Kochen.

e) Mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge tritt gelbe Färbung ein, die auf Zusatz von Essigsäure bläulich wird.

f) Mit essigsaurem Phenylhydrazin und p-Nitrophenylhydrazin erhält man nach kurzem Aufkochen krystallinische Niederschläge, jedoch nicht sehr reichlich.

Dieselben Eigenschaften zeigte das Destillat beim

Versuch 12.

Es waren 25 g Brenztraubensäure (als Kaliumsalz) mit 15 g Hefe 72 Stunden lang vergoren. Das Gärgut reagierte hier schwach alkalisch und wurde diesesmal ohne jeden Zusatz nach Filtration destilliert. Im Destillationsrückstande haben wir optisch-aktive Milchsäure, auf die gefahndet wurde, bisher nicht auffinden können.

Die Vergärung der brenztraubensauren Salze gelingt keineswegs nur mit bestimmten Heferassen. Wir haben 3 Sorten mit völlig gleichem Erfolge verwendet. Zu den Versuchen dienten teils käufliche Hefe, teils besonders gezüchtete Hefen, die wir der Güte des Herrn Prof. Lindner vom Institut für Gärungs-

gewerbe in Berlin verdanken, nämlich eine dunkle untergärige Hefe (vom Institut für Gärungsgewerbe als Hefe K bezeichnet) und eine helle Oberhefe (Hefe A benannt).[1])

Versuch 13.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; mit Oberhefe A nach 22 Stunden 10 ccm CO_2.

Versuch 14.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Natrium; mit Unterhefe K nach 22 Stunden 9 ccm CO_2.

Versuch 15.

4%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; mit Oberhefe A, nach 24 Stunden 11 ccm CO_2.

Versuch 16.

5%ige Lösung von brenztraubensaurem Kalium; mit Unterhefe K, nach 24 Stunden 11 ccm CO_2.

Zwei selbstverständliche Kontrollen sind nicht unterlassen: einmal die Feststellung, daß brenztraubensaure Salze an sich bei 36 bis 40° auch nicht Spuren von CO_2 entwickeln, und dann, daß (durch Kochen) abgetötete Hefe nicht katalytisch aus brenztraubensauren Salzen Kohlendioxyd abspaltet.

Welches auch die noch eingehend zu erforschenden Produkte der Hefeeinwirkung sind, eines läßt sich schon jetzt mit Sicherheit sagen, daß hier ein Prozeß vorliegt, der von den bisher bekannten Gärungen durch Hefe verschieden ist.

Bei der Gärung des Zuckers handelt es sich um Bildung von Äthylalkohol, bei der durch F. Ehrlichs fundamentale Untersuchungen klargelegten Vergärung der Aminosäuren in Gegenwart von sehr viel Zucker um die Entstehung der verschiedensten Alkohole (bzw. Säuren). In allen bisher bekannten Fällen sind die Prozesse ausnahmslos an die Anwesenheit von Kohlenhydraten geknüpft gewesen. Ist es doch gerade nach Ehrlich die beim Zerfall des Zuckers in Äthylalkohol und CO_2 frei werdende Energie, welche die Hefe zur Assimilierung der zugesetzten stickstoffhaltigen Materialien (Aminosäuren) befähigt, während nach ihm die Aminosäuren bei Zuckerabwesenheit allein überhaupt nicht von Hefe angegriffen

[1]) Eine vierte Hefensorte, Brennerei-Reinhefe M, die wir benutzt, aber noch nicht in Serienversuchen durchgeprüft haben, „vergärt" gleichfalls brenztraubensaure Salze glatt.

werden. Im Falle der Hefeneinwirkung auf Brenztraubensäure handelt es sich jedoch um kein Kohlenhydrat[1]).

Es lag nahe, vorläufig einmal qualitativ jene Substanzen zu prüfen, die notorisch in irgendeinem genetischen Zusammenhange mit Methylglyoxal stehen. Es waren dieses d-Weinsäure, Gärungs-Milchsäure, d, l-Alanin, d, l-Isoserin, d, l-Serin, d, l-Glycerinsäure und l-Cystin. Bei mehreren haben wir Anhaltspunkte für eine Vergärbarkeit in Abwesenheit von Zucker unter gewissen Umständen gefunden. Beim Cystin, dessen Beziehungen zur Brenztraubensäure früher klargelegt sind[2]), scheint die Einwirkung der Hefe durch die Unlöslichkeit der Substanz erschwert zu sein und andrerseits durch den entwickelten Schwefelwasserstoff auch gehemmt zu werden. Immerhin erhielten wir mit der obergärigen Hefe A innerhalb 24 Stunden 4 ccm CO_2, nach 48 Stunden 8,5 ccm reines Kohlendioxyd. Glycerinsaures Kalium sowie K- und Na-Lactat erwiesen sich innerhalb 24 Stunden mit Oberhefe A in zahlreichen Versuchen als recht glatt „gärbar"; Cystin wie glycerinsaures Kalium gerieten mit käuflicher Hefe schwächer, mit Unterhefe K überhaupt nicht in Gärung. Hier zeigten also die verschiedenen Heferassen ein vielleicht diagnostisch verwertbares Wahlvermögen.

Die Prüfung des zweiten Teils der von uns geäußerten Hypothese — wir möchten sie selbstverständlich nur als eine ganz vorläufige betrachten —, die event. Vergärbarkeit des Brenztraubenalkohols (allein oder im Gemisch mit Brenztraubensäure), muß wie die noch ausstehende Aufklärung des Prozesses und die Untersuchung anderer in dieses Gebiet der zuckerfreien Gärungen gehörigen Körper, so namentlich der Lactate, weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

Der Befund, daß nicht zu den Kohlenhydraten (und nicht zu den in Gegenwart von Zucker vergärbaren Aminosäuren) gehörende Substanzen bei der üblichen Anstellung der Gärprobe von Hefe unter massenhafter CO_2-Produktion zerlegt werden, scheint uns schon jetzt einer Mitteilung wert, da er zur vorsichtigen Beurteilung der „Gärproben" auf Zucker mahnt[3]).

---

[1]) Eine Mitwirkung von Kohlenhydraten der Hefe selbst ist auszuschließen. Denn die Selbstgärung war in Kontrollproben mit den benutzten Hefesorten und Wasser allein minimal, bei der untergärigen Hefe K praktisch gleich Null.

[2]) C. Neuberg, Ber d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3162, 1902.

[3]) Diese Mitteilung ist um so angebrachter, da soeben (im letzten Heft der Zeitschr. f. physiol. Chem.) O. Neubauer und K. Fromherz bei der Vergärung der aromatischen Substanzen Phenylaminoessigsäure und p-Oxyphenylbrenztraubensäure allerdings in Gegenwart von Zucker (nach F. Ehrlich) zu dem Schlusse kommen, daß α-Ketonsäuren ganz allgemein durch Hefe einer alkoholischen Gärung fähig seien. Unsere Befunde mit der Glycerinsäure und den Lactaten zeigen, daß für die „Vergärung ohne Zucker" jedenfalls die Ketosäurenstruktur keine Bedingung ist.

Über die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze nebst dem Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis.

Von

Kohshi Ohta.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 20. Januar 1911.)

Die chemischen Vorgänge, die in tierischen Geweben und Nahrungsmitteln beim Verfaulen und Verschimmeln derselben auftreten, haben seit jeher das Interesse der Biologen erregt. Demzufolge liegen über die Veränderungen der Eiweißkörper bei den genannten Vorgängen bereits viele wichtige Untersuchungen vor. Was indes die Veränderung des Fettes betrifft, so ist darüber unsere Kenntnis leider noch recht dürftig.

Wie aus der Literatur hervorgeht, sah M. Rubner[1]) Butterfett in Bodenerde oder in nicht sterilen Flüssigkeiten erst nach langer Zeit sich zersetzen. Dabei trat nach Rubner die Fettspaltung durch Bakterien in den Vordergrund, und die Fettzersetzung war in geringerem Grade wahrnehmbar. K. Schreiber[2]), der unter Rubners Leitung mit der Reinkultur von den aus dem Boden isolierten Bakterien und Schimmelpilzen experimentierte, konnte Rubners Befund in vollem Umfange bestätigen. Auch nach Schreiber entfaltete sich die fettzehrende Wirkung vorwiegend durch Bakterien. Fast zu gleicher Zeit beobachtete O. Laxa[3]) ebenfalls, daß die Schimmelpilze und Bakterien Fettspaltung bewirken und somit die Acidität des Fettgemisches bedeutend vermehren. Laxa konnte aus Emulsionen des Pilzes eine Lipase isolieren. Das Vorkommen von Lipase in den Schimmelpilzen wurde übrigens schon

[1]) M. Rubner, Über Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren im Boden und in Nährflüssigkeiten. Arch. f. Hyg. 38, 67, 1900.

[2]) K. Schreiber, Fettzersetzung durch Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene 41, 328, 1902.

[3]) O. Laxa, Über die Spaltung des Butterfettes durch Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene 41, 119, 1902.

früher von Camus[1]) erwähnt. Ferner beobachtete Bremer[2]) beim Verschimmeln Spaltung von Baumwollesaatöl, Hanus und Stocky[3]) dieselbe von Butterfett. Neuerdings publizierte O. Rahn[4]) eine Abhandlung über Fettzehrung der Schimmelpilze und Bakterien. Nach Rahn sollen die Pilze von Aspergillaceenarten eine starke Fettspaltung hervorrufen. Bei einer gewissen Bakterie α soll das Fettspaltungs- und Fettzersetzungsvermögen noch viel stärker sein. Hiernach beziehen sich die bisherigen Untersuchungen hauptsächlich auf die fettspaltenden Wirkungen der Schimmelpilze und Bakterien. Über die fettzehrenden Wirkungen derselben sind indessen die bis jetzt vorliegenden zahlenmäßigen Angaben ganz ungenügend.

Nun hat hierüber M. Kumagawa gelegentlich bei der Ausarbeitung seiner Fettbestimmungsmethode[5]) eine sehr interessante Beobachtung gemacht. Zu dem Zwecke der vergleichenden Untersuchungen verschiedener Fettbestimmungsmethoden wog Kumagawa im Dezember 1905 von frisch zubereitetem Rindfleischpulver 100 Proben von je 5,0 g hintereinander. Der Gehalt der einzelnen Proben an hohen Fettsäuren wurde jedoch nach seiner Verseifungsmethode im Mittel von 3 Einzelproben zu 0,358 g festgestellt. Während die Hauptproben im Vakuumapparat verschlossen aufbewahrt wurden, blieben die überschüssigen Proben in Bechergläsern einfach mit Papier bedeckt im Arbeitszimmer stehen. Gegen die Sommerperiode 1906 trat eine Verschimmelung an der Oberfläche auf, die mit der Zeit bedeutend an Intensität zunahm. Kumagawa bestimmte in großen Zeitintervallen den Fettgehalt einiger Proben und fand im Laufe der Zeit eine bedeutende Abnahme der hohen Fettsäuren. Die Probe 1, die am 13. Juli 1906 untersucht wurde, enthielt 0,328 g hoher Fettsäuren gegenüber 0,358 g als anfänglichem Wert. Die Abnahme betrug 8,5%. Die Probe 2, am 28. September 1906 untersucht, enthielt nur 0,097 g in toto.

---

[1]) Camus, Compt. rend. Soc. Biol. 49, 192 u. 230, 1897.

[2]) Bremer, Die fettzersetzenden Organismen in Nahrungs- und Futtermitteln. Diss., Münster 1902, zitiert nach Lafarschem Handb. d. techn. Mykologie 4, 253, 1907.

[3]) Hanus und Stocky, Über die chemische Einwirkung der Schimmelpilze auf Butter. Zeitschr. f. Unters. von Nahrungs- u. Genußmitteln 4, 606, 1900.

[4]) O. Rahn, Die Zersetzung der Fette. Centralbl. f. Bakt., Paras. und Infekt. II. Abt., 15, 53 u. 422, 1906.

[5]) M. Kumagawa und K. Suto, diese Zeitschr. 8, 272, 1908.

Die Abnahme betrug demnach rund 73%. Die Probe 3, am 8. Januar 1908 untersucht, enthielt nur noch 0,072 g Fettsäuren. Die Abnahme betrug hier 80%. Es blieben sonach bei dieser Probe nur noch 20% der hohen Fettsäuren unangegriffen zurück.

Diese wichtige Beobachtung übergab mir Herr Professor M. Kumagawa bereitwillig zur Publikation und veranlaßte mich zur weiteren Erforschung dieses sehr interessanten Themas. Obzwar es nach diesem Ergebnis uns ganz unzweifelhaft erschien, daß das Agens, das die Fettsäuren zum großen Teil zum Schwund gebracht hatte, in der Tat die Schimmelpilze sind, so blieb doch noch die Möglichkeit offen, daß sich auch Bakterien bei dem Prozesse mitbeteiligt hatten. Ganz ausgeschlossen ist ferner die Möglichkeit auch nicht, daß Luft, Licht und Wärme an sich die Hauptursache der Oxydation sein könnten, weil die Beobachtungszeit sich sehr in die Länge gezogen hat. Es erschien uns ferner auch wünschenswert, festzustellen, welche Arten von Schimmelpilzen denn die Wirkung am kräftigsten entfalten. Um diesen Fragen etwas näher zu treten, habe ich unter Leitung von Herrn Professor M. Kumagawa folgende Untersuchungen ausgeführt.

Zunächst habe ich das Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis untersucht. Selbstverständlich wurden alle Fettbestimmungen[1]) nach Kumagawa-Suto ausgeführt.

I. Das Verhalten des Organfettes gegen Fäulnis.

Wie erwähnt, haben Laxa und Schreiber einige Bakterien aus dem Boden isoliert und sind durch Züchtung derselben im fetthaltigen Nährsubstrate zu dem Resultate gelangt, daß dieselben eine Fettspaltung sowie Fettzehrung hervorrufen. Sie haben indessen den Ätherextrakt einfach als Fett angenommen. Ich wollte zuerst sehen, wie sich das Organfett gegen natür-

[1]) Es ist mir ganz unbegreiflich, daß W. Glikin im neu erschienenen Handbuch d. Biochemie von C. Oppenheimer von den Fettbestimmungsmethoden nur einige von Bogdanow schon als minderwertig zurückgewiesene Methoden zitiert und von der Kumagawa-Sutoschen Methode nichts erwähnt, obwohl Glikin die Kumagawa-Sutosche Abhandlung wohl bekannt sein muß, weil Glikin selber die Arbeit von Kumagawa-Suto im Biochem. Centralbl. (7, 244, 1908) referiert hat.

liche Fäulnis verhält. Zu dem Zwecke habe ich frische Pferdeleber mit der Hackmaschine zu feinem Brei zerhackt und gleichmäßig durchgemischt. Je 20 g davon werden in Glasflaschen von 100 ccm Rauminhalt genau abgewogen. Einige Proben wurden zur Kontrolle direkt nach Kumagawa-Suto verseift. Andere Proben sind in 2 Reihen geteilt. Die eine Reihe a wurde unter Zusatz von 10 ccm Wasser und die andere Reihe b ohne Wasserzusatz einfach unter dem Abzug der natürlichen Fäulnis überlassen. Je 2 bis 3 Proben wurden nach verschiedener Fäulnisdauer auf ihren Fettgehalt untersucht. Da es Sommer war, trat bald Fäulnis ein. Bei a wurde der Inhalt bald dünnbreiig und der Fäulnisgeruch immer stärker. Die obenstehende Flüssigkeit färbte sich dabei allmählich tiefbraun und zuletzt fast schwarz, der untere Bodensatz aus Gewebsfetzen blieb aber rötlich bis grau-weißlich. Bei einigen Proben entwickelten sich nach 1 Monat Madenwürmer. Die Reihe b ohne Wasserzusatz begann nach einigen Tagen an der Oberfläche zu verschimmeln, indem hie und da fleckenweise bräunlicher, grüner und weißer Schimmel auftrat. Diese Kolonien verwuchsen nach einiger Zeit miteinander und bedeckten die ganze Oberfläche, die dann von feucht glänzenden, dunkelbraunen Schimmeln dicht membranös bedeckt ist.

In der Innenschicht blieb indessen die rötliche Färbung erhalten. Der Brei wurde allmählich braun und neigte zur Verflüssigung, so daß der ganze Inhalt nach 1 Monate nahezu dünnbreiig aussah. Unter starkem Fäulnisgeruch entwickelten sich auch bei dieser Reihe nach etwa 20 Tagen Madenwürmer.

Die Resultate sind in folgenden Tabellen verzeichnet.

Tabelle I.

Petrolätherextrakt der Pferdeleber bei Fäulnis nach verschiedener Dauer.

A. Fettgehalt der Leber vor dem Versuche.

Versuchs-Nr.	Menge des Organbreies	Gereinigtes Petrolätherextrakt		Farbe	Hohe Fettsäuren		Cholesterin	
	g	g	%		g	%	g	%
1	20,0	0,7926	3,963	gelblich	0,7398	3,699	0,0528	0,264
2	20,0	0,7730	3,865	„	0,7214	3,607	0,0516	0,254
Mittel	20,0	0,7828	3,914		0,7306	3,653	0,0522	0,261

B. Fäulnis mit Wasserzusatz.

Versuchs-Nr.	Fäulnisdauer Tage	Menge des Organbreies g	Petrolätherextrakt (Hohe Fettsäuren + Cholesterin) g	%	Farbe
1	5	20,0	0,8048	4,024	gelb
2		20,0	0,7666	3,833	gelblich
3		20,0	0,8060	4,030	gelb
1	10	20,0	0,8700	4,350	bräunlich
2		20,0	0,8618	4,309	"
3		20,0	0,8640	4,320	"
1	20	20,0	0,8588	4,294	braun
2		20,0	0,8460	4,230	bräunlich
3		20,0	0,9292	4,646	braun
1	30	20,0	0,9078	4,539	tiefbraun
2		20,0	0,9566	4,283	schwärzlich
3		20,0	0,9644	4,822	"
1	40	20,0	0,7124	3,562	bräunlich
2		20,0	0,8430	4,215	braun
1	50	20,0	0,8886	4,443	braun
2		20,0	0,8546	4,273	bräunlich
3		20,0	0,9620	4,810	tiefbraun
1	60	20,0	0,8666	4,333	tiefbraun
2		20,0	0,8500	4,250	"
3		20,0	0,8592	4,296	"

C. Fäulnis ohne Wasserzusatz.

Versuchs-Nr.	Fäulnisdauer Tage	Menge des Organbreies g	Petrolätherextrakt (Hohe Fettsäuren + Cholesterin) g	%	Farbe
1	5	20,0	0,7878	3,939	gelblich
2		20,0	0,8264	4,132	gelb
1	10	20,0	0,8566	4,283	bräunlich
2		20,0	0,8546	4,273	"
3		20,0	0,8526	4,263	"
1	20	20,0	0,7982	3,991	braun
2		20,0	0,8980	4,490	bräunlich
3		20,0	0,8816	4,408	"
1	30	20,0	0,9156	4,528	braun
2		20,0	0,9838	4,919	"
3		20,0	0,8588	4,294	"
1	40	20,0	0,8714	4,357	braun
2		20,0	0,9426	4,713	schwärzlich
3		20,0	0,9480	4,740	"
1	50	20,0	1,0436	5,218	tiefbraun
2		20,0	0,9622	4,811	"
1	60	20,0	1,3828	6,914	tiefbraun

Wie in der Tabelle verzeichnet, nimmt die Quantität der Petrolätherextrakte im allgemeinen mit der Dauer der Fäulnis bedeutend zu. Die Zunahme beträgt in den einzelnen Proben über 20%. Allerdings sind auch größere Schwankungen vorhanden. Wenn man aus diesem Befunde allein das Verhalten des Gewebsfettes gegen natürliche Fäulnis beurteilt, so müßte man unbedingt den Schluß ziehen, daß das Fett entsprechend der Steigerung der Petrolätherextrakte sich mit der Fäulnisdauer aus anderen Verbindungen neubildet. Wenn man indessen die Beschaffenheit und die Natur der Petrolätherextrakte der stark verfaulten Pferdeleber etwas genauer betrachtet, so sind dieselben von denjenigen ganz verschieden, die man bis jetzt von verschiedenen Geweben und Nahrungsmitteln bei der Verseifung gewonnen hat. Vor allem zeichnet sich das Petrolätherextrakt der stark verfaulten Pferdeleber durch eine braunschwarze Farbe aus, deren Intensität mit der Fäulnisdauer fast parallel zunimmt, während das Petrolätherextrakt der frischen Gewebe nach der Verseifung nur blaßgelb gefärbt ist und aus reinen Fettsäuren mit etwas Cholesterin besteht. Da die Leber Bestandteile von Galle und Blut enthält, so könnten hieraus nach vorgeschrittener Fäulnis und durch darauf folgende Verseifung wohl solche Zersetzungsprodukte entstehen, die entweder an sich schon petrolätherlöslich sind oder durch gegenseitige Wirkung verschiedener Produkte sich im Petroläther gelöst vorfinden. Aus dieser Vermutung heraus habe ich vergeblich verschiedene Lösungsmittel durchprobiert, um aus dem stark gefärbten Petrolätherextrakte hohe Fettsäuren in reinem Zustande zu isolieren. Da die Schwierigkeiten nicht leicht zu überwinden schienen, so müßte ich mich zurzeit damit begnügen, einige Beimengungen im gefärbten Petrolätherextrakte nachzuweisen. Der erwärmte Wasserauszug des Petrolätherextraktes färbte sich mit Millonschem Reagens rot (aromatische Oxysäuren) und mit Kaliumnitrit und konzentrierter Schwefelsäure rot (Indol). Durch Schmelzen des Petrolätherextraktes mit Salpetermischung wurde die Gegenwart von Phosphor und Schwefel nachgewiesen. Durch Veraschen des Extraktes in der Platinschale konnte sogar die Gegenwart von Eisen, wenn auch in geringer Menge, nachgewiesen werden. Die Prüfung auf Gallenfarbstoff und Gallensäuren im Extrakte ist

negativ ausgefallen. Andere Untersuchungen wurden nicht gemacht.

Aus diesen Untersuchungen geht so viel mit Sicherheit hervor, daß das Petrolätherextrakt der stark verfaulten Leber nach der Verseifung bedeutende Mengen von Verunreinigungen enthält. Demnach ist der Schluß nicht gestattet, daß die Fäulnis den Fettgehalt der Leber vermehrt, obwohl die Menge des Petrolätherextraktes nach der Verseifung bedeutend vermehrt ist. Demnach ist selbst die Verseifungsmethode nach Kumagawa-Suto nicht imstande, den Fettgehalt der stark verfaulten Leber festzustellen. Wenn man wie früher das Ätherextrakt einfach als Fett angenommen hätte, so hätte man in solchen Fällen einen wohl noch größeren Fehler begangen. Die Frage, ob auch andere Gewebe oder Organe nach der natürlichen Fäulnis ganz ebenso wie die Leber für die Fettbestimmung unzugänglich werden, läßt sich ohne diesbezüglich besonders angestellte Experimente nicht beantworten. Mir scheint indes, daß diese unangenehme Eigenschaft fast spezifisch für die Leber zur Geltung kommt, weil das Petrolätherextrakt selbst der ganz frischen Leber bei der Verseifung stets etwas stärker gefärbt ist als dasjenige der anderen Organe, und das Schwarzwerden der Fäulnisprodukte bei anderen Organen und Geweben mir bis jetzt nicht bekannt ist. Die Vermehrung der gefärbten Petrolätherextrakte bei diesem Versuche darf unter keinen Umständen auf die Vermehrung der Fettmenge selbst zurückgeführt werden, weil besonders bei der Versuchsreihe b ohne Wasserzusatz die Verschimmelung mehr in den Vordergrund trat, als die Fäulnis durch Saprophyten. Bei der Verschimmelung findet im Gegenteil Fettzehrung statt, wie dieselbe Kumawaga schon nachgewiesen hat und wie ich bestätigen kann.

Um das Verhalten des Leberfettes gegen Fäulnis einwandfrei festzustellen, kommt somit nur das Verfahren zur Geltung, wonach man die Reinkultur der einzelnen Saprophyten in steriler Leber wachsen läßt und den Fettgehalt vor und nach der Kultur vergleicht. Diese Prüfung ist aus äußeren Gründen ausgeblieben. Im folgenden habe ich zunächst die Wirkung der Schimmelpilze gegen Organfett in Betracht gezogen.

II. Die Wirkungen der Schimmelpilze auf das Organfett.

Wie wir eben bei der Fäulnis gesehen haben, gibt uns die Prüfung der vorgelegten Frage mit dem Gemenge von Bakterien und Schimmelpilzen keinen richtigen Aufschluß. Zur definitiven Entscheidung derselben ist es durchaus nötig, daß man mit Reinkulturen der Schimmelpilze arbeitet und den Fettgehalt des Organpulvers vor und nach der Aussaat der Pilze vergleicht. Hierzu ist in erster Linie eine Isolierung der Schimmelpilze notwendig.

Isolierung der Schimmelpilze.

Etwa 9 cm weite, vorher sterilisierte Petrischalen mit Gelatinenährboden wurden 1 Stunde lang offen im Arbeitszimmer belassen, dann bedeckt bei 22° C im Brutschrank aufbewahrt. Genau ebenso wurde eine Probe von lufttrocknem Pferdeleberpulver von etwa 5 g mit einigen Kubikzentimetern Wasser befeuchtet und vorher durch Dampfsterilisation keimfrei gemacht, in den Petrischalen behandelt. Von solchen Versuchen wurden mehrere Proben hintereinander angestellt. Nach etwa 1 Woche entwickelten sich an der Oberfläche der beiden Proben zahlreiche Kolonien. Hieraus wurden einzelne Kolonien durch Stichkultur in Gelatinenährboden übergeimpft. Durch wiederholte Versuche habe ich aus der Luft meines Arbeitszimmers mehrere Arten Schimmelpilze in Reinkultur erhalten, wovon 5 Arten zu den folgenden Untersuchungen ausgewählt wurden. Diese 5 Pilzarten sind von dem erfahrenen Mykologen K. Saito identifiziert worden:

1. Cladosporium herbarum,
2. Penicillium glaucum,
3. Aspergillus glaucus,
4. Aspergillus nidulans,
5. Actinomucor repens, Schostakowitsch.

Die ersten 4 Arten sind ganz allgemeine Schimmelpilze, die überall vorkommen. Saito[1]) konnte in verschiedenen Jahreszeiten und in verschiedenen Orten Tokios bis jetzt etwa 50 Arten Schimmelpilze isolieren. Hierbei hat Saito die obgenannten 4 Arten nirgends vermißt. Dagegen soll Actinomucor repens[2]) äußerst selten vorkommen. Nach langjähriger mykologischer Erfahrung von K. Saito soll mein Fall der dritte sein.

[1]) K. Saito, Die athmosphärischen Pilzkeime. Journ. of the science college, Imper. Univ. Tokio, Japan, 18, Art. 5.

[2]) Schostakowitsch, Actinomucor repens, n. Gen. n. sp. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 16, 155, 1898.

Fettverlust bei der Sterilisation des Nährsubstrates.

Ich habe auch bei diesem Versuche lufttrockenes Pferdeleberpulver zum Substrate benutzt. Es war nötig, das Substrat vor dem Überimpfen der Pilze durch Dampfsterilisation keimfrei zu machen. Da ich es für möglich hielt, daß ein Fettverlust durch diese Operation stattfinden könnte, so habe ich folgende Versuche angestellt. Je 1 bis 3 g lufttrockenes Leberpulver wurde in Erlenmeyer-Kolben gebracht, 5 ccm Wasser zugesetzt, mit Watte verschlossen und 2 Tage hintereinander je 1 stündlich im Dampfbad bei 100° C sterilisiert. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß hierdurch vollkommene Abtötung der Keime erzielt worden ist. Die Fettbestimmungen vor und nach dieser Sterilisation haben, wie erwähnt, eine geringe Oxydation des Fettes ergeben, wie die nachstehende Tabelle dies erläutert.

Tabelle IIa.

Fettgehalt des Pferdeleberpulvers vor und nach der Sterilisation.

	Versuchs-Nr.	Menge des Organpulvers g	Petrolätherextrakt g	Petrolätherextrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
Vor der Sterilisat.	1	1,4962	0,1634	10,91	0,1524	10,18	0,0110	0,734
	2	1,4076	0,1540	10,94	0,1434	10,21	0,0104	0,739
	3	2,6758	0,2880	10,78	0,2676	10,00	0,0210	0,783
	Mittel	1,8599	0,2020	10,88	0,1878	10,13	0,0141	0,752
Nach der Sterilisation	1	2,2656	0,2440	10,76	0,2246	9,913	0,0194	0,857
	2	1,9594	0,2050	10,47	0,1936	9,863	0,0116	0,592
	3	2,8352	0,2980	10,51	0,2787	9,881	0,0193	0,681
	4	2,2142	0,2354	10,62	0,2178	9,817	0,0176	0,795
	Mittel	2,3186	0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731

Tabelle IIb.

Übersichtstabelle von Tabelle IIa.

Vergleich des Organfettes vor und nach der Sterilisation.

	Petrolätherextr. %	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin %
Vor der Sterilisation	10,88 (100)	10,13 (100)	0,752 (100)
Nach der Sterilisation	10,59 (97,3)	9,869 (97,5)	0,731 (97,2)
Differenz in Prozent.	– 2,7	– 2,5	– 2,8

Wie die Tabelle angibt, hat die Sterilisation zu einem Fettverluste von 2,5 bis 2,7 % geführt. In den folgenden Ver-

suchen habe ich deshalb den Fettgehalt des Leberpulvers nach der Sterilisation als den Normalwert zugrunde gelegt. Da die Größe der Verluste wesentlich von der Dauer der Sterilisation und zugesetzten Wassermenge abhängig ist, so habe ich in den Hauptversuchen alle Bedingungen möglichst gleichmäßig gestaltet.

Versuchsreihe 1.

Vergleichende Untersuchungen der fettzehrenden Wirkungen von 5 Schimmelpilzarten.

Wie erwähnt, wurden 1 bis 3 g Organpulver in Erlenmeyer-Kolben genau abgewogen und unter Zusatz von 5 ccm Wasser 2 Tage hintereinander je 1 Stunde mit Dampf sterilisiert. Darauf wurden die Pilzrasen eingeimpft. Hierzu wurde von den erwähnten Reinkulturen die Rasenoberfläche mit einer Platinöse abgestrichen und dieselbe in 10 ccm steriles Wasser hineingebracht. Nach der Durchmischung derselben wurden hiervon 0,2 ccm Sporenaufschwemmung mittels Pipette in die Erlenmeyer-Flaschen gegeben, noch 5 ccm Wasser zugesetzt und mit Wattepropf verschlossen. Selbstverständlich geschah alles unter streng aseptischen Kautelen. Die so hergestellten Proben blieben im Winter bei 22° C im Brutofen und im Sommer einfach im Zimmer liegen. Nach einigen Tagen sieht man die anfangs ganz zerstreut und fleckenweise bemerkbaren Pilzrasen sich rasch entwickeln und bald miteinander konfluieren, so daß vor allem bei Actinomucor repens nach etwa 2 Wochen der Innenraum der etwa 150 ccm fassenden Flaschen fast mit Pilzrasen voll gefüllt werden. Daß die Rasen rein und einstämmig sind, ließ sich sowohl makroskopisch wie mikroskopisch leicht feststellen. Alle Proben wurden nach etwa 1 Monate durch Zusatz von Verseifungslauge gleichzeitig abgetötet und weiter nach Kumagawa-Suto auf ihren Fettgehalt untersucht. Die Kontrollprobe, die nach der Sterilisation ohne Pilzimpfung aufbewahrt wurde, blieb dauernd ganz steril. Die Resultate der Fettbestimmungen in den verschiedenen Pilzarten sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Tabelle IIIa.

Fettgehalt des Pferdeleberpulvers nach der Züchtung verschiedener Schimmelpilze.

Art der geimpften Schimmelpilze	Menge des Organpulvers	Petrolätherextrakt		Hohe Fettsäuren		Cholesterin	
	g	g	%	g	%	g	%
Vor dem Versuche . .	2,3186	0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
Cladosporium herbarum	2,3576	0,2332	9,889	0,2112	8,794	0,0210	0,891
Penicillium glaucum .	3,2048	0,3130	9,757	0,2800	8,742	0,0330	1,030
Aspergillus glaucus . .	2,0906	0,1738	8,313	0,1586	7,590	0,0152	0,727
Aspergillus nidulans . .	2,2808	0,1824	7,998	0,1692	7,418	0,0132	0,597
Actinomucor repens . .	2,1362	0,1148	5,375	0,1002	4,690	0,0146	0,684

Tabelle IIIb.

Die Fettabnahme des Organpulvers nach der Züchtung der Schimmelpilze.

Art der geimpften Schimmelpilze	Petrolätherextrakt %		Hohe Fettsäuren %	
	Gefunden	Verlust	Gefunden	Verlust
Vor dem Versuche	10,59	—	9,869	—
Cladosporium herbarum . . .	9,889	6,62	8,794	10,91
Penicillium glaucum	9,757	7,87	8,742	11,42
Aspergillus glaucus	8,313	21,50	7,590	23,12
Aspergillus nidulans	7,998	24,48	7,418	24,84
Actinomucor repens	5,375	49,24	4,690	52,48

Die Petrolätherextrakte sind ganz schwach gelblich gefärbt und bestehen aus reinen Fettsäuren mit etwas Cholesterin. Was die Wirkungen der Schimmelpilze auf das Organfett betrifft, so haben alle von mir untersuchten 5 Pilzarten in beträchtlichem Grade Organfett zum Schwund gebracht. Die Intensität der fettzehrenden Wirkung ist indessen, wie n der Tabelle verzeichnet, je nach den Pilzarten großen Schwankungen unterworfen. Die Wirkungen von Cladosporium herbarum und Penicillium glaucum waren in dieser Hinsicht am schwächsten. Sie haben rund 11% der Fettsäuren verzehrt. Die beiden Aspergillusarten haben dagegen 23 bis 25% des Fettes verzehrt. Am kräftigsten war die Wirkung von Actinomucor repens. Derselbe hat 52,5%, also über die Hälfte des Gesamtfettes zum Schwund gebracht.

Um diesen Schluß aufrecht zu erhalten, muß betreffs der Untersuchungsmethode noch folgender Punkt berücksichtigt werden. Bei der Ausführung der Fettbestimmungsmethode nach Kumagawa-Suto entsteht bekanntlich bei der Überneutralisation der Verseifungsgemische mit Salzsäure ein flockiger Niederschlag in ganz winziger Menge. Der Verdacht, daß eine geringe Menge hoher Fettsäuren in diesen Flocken eingeschlossen der Bestimmung entgehen möge, kann, wie in der Vorschrift genau angegeben ist, leicht dadurch entkräftet werden, daß dieselben noch einmal in wenig Alkali aufgelöst, mit Äther geschüttelt und dann wieder angesäuert werden. Bei der Verseifung der mit Pilzrasen durchsetzten Organpulver und darauffolgender Überneutralisation mit Säure entsteht nun der Niederschlag in viel größerer Menge als sonst. Derselbe löst sich weder in Lauge noch in Säure auf. Bei der mikroskopischen Untersuchung hat sich ergeben, daß dieser Niederschlag nichts anderes als ein Konglomerat von Schimmelpilzrasen ist. Wegen der Größe des Niederschlages ist hier die Möglichkeit wohl zu beachten, daß derselbe einen Teil der hohen Fettsäuren in sich einschließt und an den Äther nicht abgibt, wodurch ein scheinbarer Fettverlust verursacht wird. Wenn auch dieser Scheinverlust unmöglich groß sein kann, so habe ich diesen Wert besonders untersucht. Hierzu habe ich sämtliche Pilzrasenniederschläge von 5 Proben auf entfettetem Filterpapier vereinigt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde im Heißextraktor

nach Kumagawa-Suto 5 Stunden lang mit siedendem absolutem Alkohol extrahiert. Durch Verseifung des Alkoholextraktes haben sich für 5 Proben zusammen folgende Werte ergeben:

Petrolätherextrakt . . .	0,0998 g
Hohe Fettsäuren	0,0888 g
Cholesterin	0,0110 g

Hieraus berechnet sich das Petrolätherextrakt für eine Probe zu rund 0,02 g = 7 % des Gesamtfettes. Die Frage, ob diese geringe Fettmenge einfach mechanisch mitgerissen ist, oder ob dieselbe vielmehr zu den physiologischen Bestandteilen der Pilzleiber gehört, lasse ich zurzeit dahingestellt.

Wenn demnach derjenige Teil hoher Fettsäuren, der in den Pilzrasen eingeschlossen der Bestimmung entgeht, den wahren Fettverlust infolge der Fettzehrung durch Schimmelpilze bei weitem nicht decken kann, so ist jener Wert doch immerhin ansehnlich, so daß derselbe durchaus nicht vernachlässigt werden darf. Da in dieser Versuchsreihe auf dieses Verhalten keine genügende Rücksicht genommen war, so habe ich noch folgende Versuchsreihe angestellt, in der auch noch andere Momente mit genügender Exaktheit berücksichtigt worden sind.

Versuchsreihe 2.

Wiederholte Untersuchungen von 5 Schimmelpilzarten auf ihre fettzehrenden Wirkungen.

Alle Versuchsanordnungen sind genau ebenso wie bei der Versuchsreihe 1 getroffen. Für alle einzelnen Bestimmungen sind außerdem die Pilzniederschläge gesondert mit siedendem Alkohol 5 Stunden lang extrahiert und die daraus durch Verseifung gewonnenen Fettsäuren in der Tabelle als b bezeichnet, während die Hauptwerte als a bezeichnet wurden. Alle hierzu benutzten sogenannten entfetteten Filterpapiere von Schleicher-Schüll sowie entfettete Watte sind nochmals im Heißextraktor nach Kumagawa-Suto durch 5stündige Extraktion mit siedendem Alkohol von jeglichem Lipoid vollständig befreit worden, was, wie ersichtlich, sehr umständlich und zeitraubend war. Auch bei dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung der üppig gedeihenden Pilzrasen nach 1monatiger Wachstumsdauer durch Zusatz von Verseifungslauge gleichzeitig unterbrochen. Die gewonnenen Resultate sind in der folgenden Tabelle IVa und IVb verzeichnet.

Wie die Tabelle angibt, stimmen die Resultate dieser nach allen Richtungen hin als einwandfrei zu erachtenden Versuchsreihe mit denjenigen der vorhergehenden im großen und ganzen gut überein. Nur sind die fettzehrenden Wirkungen von Penicillium und Aspergillus etwas schwächer ausgefallen als diejenigen bei der Versuchsreihe 1. Daß Actinomucor repens unter 5 Pilzarten am stärksten fettzehrende Wirkung besitzt, ist auch durch diese Versuche außer Zweifel gestellt. Derselbe hat bei diesem Versuche sogar 52 bis 64 % des Gesamtfettes zum Schwund gebracht. Somit ist die eingangs erwähnte Beobachtung von

Kumagawa durch diese Versuchsreihe vollständig bestätigt worden. Die fettzehrenden Wirkungen der Schimmelpilze sind indessen je nach den Pilzarten sehr verschieden.

Tabelle IVa.

Fettzehrung bei der Züchtung verschiedener Schimmelpilze in dem Organpulver.

Nummer	Geimpfter Schimmelpilz	Menge des Organpulvers g		Petrolätherextrakt g	Petrolätherextrakt %	Hohe Fettsäuren g	Hohe Fettsäuren %	Cholesterin g	Cholesterin %
	Vor dem Versuche	2,3186		0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
1	Cladosporium herbarum	2,1904	a	0 1968	8,986	0,1790	8.173	0.0178	0,813
			b	0,0088	0,4018	0 0068	0,310	0 0020	0,091
			a+b	0,2056	9,388	0,1858	8,484	0,0198	0,904
2	Penicillium glaucum	3,1694	a	0 3002	9.472	0,2734	8 626	0 0268	0.846
			b	0.0210	0,6656	0,0198	0,6277	0 0012	0,038
			a+b	0,3212	10,14	0,2932	9,254	0,0280	0,884
3	Penicillium glaucum	2,5900	a	0 2390	9.228	0,2150	8.301	0.0240	0 927
			b	0,0238	0,9189	0,0212	0 8185	0.0026	0.100
			a+b	0,2628	10.15	0,2362	9.120	0,0266	1,027
4	Aspergillus glaucus	3,2914	a	0,2848	8.646	0.2564	7,789	0.0282	0,857
			b	0,0120	0.3646	0.0096	0,2917	0,0024	0.073
			a+b	0,2968	9,011	0,2660	8,081	0,0306	0,930
5	Aspergillus glaucus	3,3702	a	0,2930	8,696	0 2637	7,826	0.0293	0.870
			b	0.0156	0,4629	0.0130	0.3858	0.0026	0.077
			a+b	0,3086	9,159	0,2767	8,212	0,0319	0,947
6	Aspergillus nidulans	2,6526	a	0,1928	7.269	0,1738	6.552	0 0190	0,716
			b	0.0386	1,455	0 0346	1.304	0 0040	0 151
			a+b	0.2314	8,724	0,2084	7,856	0,0230	0,867
7	Aspergillus nidulans	2,7366	a	0,2192	8,009	0.1982	7,242	0.0210	0.767
			b	0,0310	1.133	0,0274	1,001	0.0036	0 132
			a+b	0 2502	9,142	0,2256	8,243	0,0246	0,899
8	Actinomucor repens	3,0518	a	0.1573	5 154	0.1329	4,354	0,0244	0,800
			b	0.0167	0.5473	0.0127	0,4162	0 0040	0,131
			a+b	0.1740	5,701	0,1456	4,770	0 0284	0,931
9	Actinomucor repens	1,7904	a	0.0653	3,647	0 0473	2,634	0.0180	1,013
			b	0,0211	1.179	0 0154	0,8601	0,0057	0,318
			a+b	0,0864	4 826	0.0627	3,494	0,0237	1,331

Bei den bisherigen Versuchen ist jedoch die Wachstumsdauer der Pilze auf 1 Monat verlängert. Augenscheinlich vermehren sich die Pilzrasen nach etwa 2 Wochen nicht mehr. Es war deshalb interessant, zu sehen, ob die fettzehrenden Wirkungen der Pilze in dem Momente schon ihre maximale Grenze erreichen, wo ihr Wachstum anscheinend stillsteht. Zu

Tabelle IVb.
Übersichtstabelle von Tabelle IVa.
Fettzehrung verschiedener Schimmelpilze.

Nummer	Geimpfter Schimmelpilz		Petrolätherextrakt % Gefunden	Petrolätherextrakt % Verlust	Hohe Fettsäuren % Gefunden	Hohe Fettsäuren % Verlust
	Vor dem Versuche . .		10,59	—	9,869	—
1	Cladosporium herbarum	a	8,986		8,173	
		b	0,402		0,310	
		a+b	9,388	11,3	8,484	14,1
2	Penicillium glaucum .	a	9,472		8,626	
		b	0,666		0,628	
		a+b	10,14	4,3	9,254	6,2
3	Penicillium glaucum .	a	9,228		8,301	
		b	0,919		8,819	
		a+b	10,15	4,2	9,120	7,6
4	Aspergillus glaucus . .	a	8,646		7,789	
		b	0,365		0,292	
		a+b	9,011	14,9	8,081	18,1
5	Aspergillus glaucus . .	a	8,696		7,826	
		b	0,463		0,386	
		a+b	9,159	13,5	8,212	16,8
6	Aspergillus nidulans .	a	7,269		6,552	
		b	1,455		1,304	
		a+b	8,724	17,6	7,856	20,4
7	Aspergillus nidulans .	a	8,009		7,242	
		b	1,133		1,001	
		a+b	9,142	13,7	8,243	16,5
8	Actinomucor repens .	a	5,154		4,354	
		b	0,547		0,416	
		a+b	5,701	46,2	4,770	51,7
9	Actinomucor repens .	a	3,647		2,634	
		b	1,179		0,860	
		a+b	4,826	54,4	3,494	64,6

dem Zwecke habe ich mit Actinomucor repens noch folgende Versuche angestellt.

Versuchsreihe 3.
Fettzehrende Wirkung von Actinomucor repens nach kürzerer Wachstumsdauer.

Hierzu habe ich 2 Arten von Versuchen angestellt. Bei A (Bezeichnung der Tabelle) habe ich wie sonst als Nährboden Leberpulver benutzt und die Wachstumsdauer teils auf 2 Wochen, teils auf 3 Wochen beschränkt. Bei B habe ich als Nährsubstrat Reiskleie benutzt und die Wachstumsdauer auf 2 Wochen beschränkt. Bei B habe ich ferner

Fettbestimmungen der Reiskleie vor und nach der Kultur durch Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung ausgeführt.[1] Sonst sind auch diese Versuche bis auf die Einzelheiten genau ebenso ausgeführt wie die vorhergehenden. Die Resultate sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle Va.

A. Fettzehrung von Actinomucor repens bei Züchtung in dem Organpulver (Pferdeleber).

Versuchs-Nr.	Menge d. Organpulvers	Wachstumsdauer		Petroläther-extrakt		Hohe Fettsäuren		Cholesterin	
	g			g	%	g	%	g	%
Vor d. Vers.	2,3186	0		0,2457	10,59	0,2287	9,869	0,0170	0,731
1	1,9328	2 Woch.	a	0,0906	4,687	0,0774	4,004	0,0132	0,683
			b	0,0292	1,511	0,0250	1,294	0,0042	0,217
			a+b	0,1198	6,198	0,1024	5,298	0,0174	0,900
2	1,2300	3 Woch.	a	0,0327	2,659	0,0287	2,334	0,0040	0,325
			b	0,0212	1,724	0,0168	1,366	0,0044	0,358
			a+b	0,0539	4,383	0,0455	3,700	0,0084	0,683
3	1,6540		a	0,0724	4,376	0,0617	3,730	0,0107	0,646
			b	0,0168	1,016	0,0130	0,7863	0,0038	0,230
			a+b	0,0892	5,392	0,0747	4,516	0,0145	0,876

B. Fettzehrung von Actinomucor repens bei Züchtung in der Reiskleie.

	Nr.	Menge d. Reiskleie	Wachstumsdauer	Petroläther-extrakt		Hohe Fettsäuren		Cholesterin	
		g		g	%	g	%	g	%
Vor d. Vers.	1	1,8734	0	0,2514	13,42	0,2368	12,59	0,0156	0,822
	2	2,1162		0,2848	13,46	0,2644	12,49	0,0204	0,964
	Mittel	1,9948		0,2681	13,44	0,2506	12,54	0,0180	0,893
Nach d. Vers.	1	1,2652	2 Woch.	0,0998	7,868	0,0810	6,397	0,0188	1,419
	2	1,7556		0,1436	8,179	0,1192	6,790	0,0244	1,390

[1]) Zuerst habe ich für die Fettbestimmung der Kleie ebenfalls die direkte Verseifungsmethode versucht. Indessen löst sich die Kleiemasse bei der Verseifung nicht vollständig, und bei der Überneutralisation mit Salzsäure quillt die Masse gallertig auf. Hierdurch wird die Extraktion mit Äther sehr erschwert; deshalb habe ich hier die zweite Methode von Kumagawa-Suto, nämlich Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung, vorgezogen. Bei allen kohlenhydratreichen pflanzlichen Materialien scheint die letztere Methode der direkten Verseifungsmethode überlegen zu sein.

Tabelle V b.
(Übersichtstabelle von Tabelle V a.)
Fettzehrung von Actinomucor repens.

	Versuchs-Nr.	Versuchsmaterial	Wachstumsdauer		Petrolätherextrakt Gefund. %	Petrolätherextrakt Verlust %	Hohe Fettsäuren Gefund. %	Hohe Fettsäuren Verlust %
A.	Vor d. Vers.	Leberpulver	0		10,59	—	9,869	—
	1	"	2 Woch.	a	4,687		4,004	
				b	1,511		1,294	
				a+b	6,198	41,5	5,298	46,3
	2	"	3 Woch.	a	2,659		2,334	
				b	1,724		1,366	
				a+b	4,383	58,6	3,700	62,5
	3	"	3 Woch.	a	4,376		3,730	
				b	0,016		0,786	
				a+b	5,392	49,1	4,516	54,2
B.	Vor d. Vers.	Reiskleie	0		13,44	—	12,54	—
	1	"	2 Woch.		7,868	41,5	6,394	49,2
	2	"	2 Woch.		8,179	39,1	6,790	46,1

Hiernach hat Actinomucor repens schon nach 2wöchentlicher Wachstumsdauer über 46% und nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer sogar 54 bis 63% hoher Fettsäuren zum Schwund gebracht. Die Intensität der Fettzehrung entspricht ungefähr dem makroskopischen Befund der Pilzrasenentwicklung. Wenn das Wachstum der Pilzrasen stillsteht, so scheint keine Fettzehrung mehr stattzufinden, denn der prozentische Verlust des Fettes nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer (63%) ist verglichen mit demjenigen nach 1 Monat (62%) fast gleich geblieben.

III. Einige mißlungene Versuche der Züchtung von Actinomucor repens in einfachen fetthaltigen Nährböden.

Nachdem ich mich von der ganz energisch fettzehrenden Wirkung von Actinomucor repens überzeugt hatte, wollte ich versuchen, mittels dieses Pilzes Abbauprozesse des Fettes kennen zu lernen. Nach meiner Erfahrung wächst dieser Pilz in verschiedenen festen Nährböden sehr üppig, so namentlich auf Reiskleie, gekochtem Reis, Organpulver sowie in Gelatinenährböden. Solche Nährböden sind indessen, wie ersichtlich, für unsere Zwecke nicht geeignet, weil in ihnen neben Fett viel Eiweiß und Kohlenhydrate enthalten sind. Die Schwierigkeit liegt darin, daß die

Aufgabe sich nur dann ganz einwandfrei lösen läßt, wenn der Pilz in einem solchen Nährboden üppig wächst, in dem außer Fett weder Eiweiß noch Kohlenhydrat enthalten ist. Hierüber habe ich einige Versuche angestellt, indem ich als Fett denjenigen Teil der geschmolzenen Schweineschmalze, der im Eisschrank flüssig blieb, und gegen Rosolsäure ganz schwach sauer reagierte, und als Nährsalzlösung folgende Mischung benutzte:

5 g KH_2PO_4, 2,5 g $MgSO_4$, 15 Tropfen $FeCl_3$ (5%ig), Aq. destillata ad 1 l.

Zu dieser Nährsalzlösung wurden als Stickstoffquelle dann 10 g Harnstoff zugesetzt.

Öl und Nährsalzlösung allein in verschiedener Mischung mit Pilzsporenaufschwemmung geimpft, weisen keine Entwicklung der Schimmelpilze selbst nach Wochen auf. In konzentrierter Peptonlösung (Witte) entwickeln sich die Pilze sehr unvollkommen. Ebenso dürftig war das Wachstum in fetthaltiger Peptonlösung. Wird hierzu Nährsalzlösung zugesetzt, so wächst der Pilz ziemlich gut. In mit Wasser oder Nährsalzlösung befeuchtetem Stärkemehl wächst der Pilz sehr mangelhaft. Wird hierzu Fett gesetzt, so findet ein reichliches Wachstum der Pilze statt. Die Schimmelpilze wachsen im allgemeinen nur an der Oberfläche der Flüssigkeit, nicht aber in ihrem inneren Teil. Sie gedeihen in festen Nährböden viel besser als in flüssigen. Daher habe ich verschiedene mit Nährsalzlösung befeuchtete Gemische von Öl und indifferenten Pulvern, wie z. B. Seesand, Quarzsand, Talkpulver u. dgl. versucht. Aber sie wachsen nur langsam und spärlich. Somit konnte ich den gewünschten Zweck nicht erreichen.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse.

1. Die Beobachtung von M. Kumagawa, daß lufttrockenes Organpulver (Rindfleisch) beim Verschimmeln in beträchtlichem Grade seinen Fettgehalt einbüßt, konnte ich durch die Reinkultur verschiedener Schimmelpilze in lufttrockenen Pferdeleberpulvern vollkommen bestätigen.

2. Alle von mir untersuchten 5 Schimmelpilze, nämlich Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum, Aspergillus glaucus, Aspergillus nidulans und Actinomucor repens haben fettzehrende Wirkungen. Dieselben sind indessen je nach den Pilzarten sehr verschieden. Unter den aufgezählten Pilzen hat Actinomucor repens eine am stärksten fettzehrende Wirkung. Derselbe hat nach 3wöchentlicher Wachstumsdauer über 60% des Leberfettes zum Schwund gebracht. Dann verzehrten Aspergillusarten 17 bis 20%, Cladosporium herbarum 14% und Penicillium glaucum nur 6 bis 8% des Leberfettes.

3. Die Versuche, Actinomucor repens in einfachen fetthaltigen Nährböden zu züchten, um den Abbauprozeß des Fettes näher kennen zu lernen, sind mißlungen.

4. Bei der Fettbestimmungsmethode bleiben die Pilzrasen auch nach der Verseifung ungelöst und bilden bei der Neutralisation mit Salzsäure Niederschläge, die etwas Fettsäuren einschließen. Dieselben entgehen der Bestimmung, wenn sie nicht besonders extrahiert werden. Deshalb eignet sich hier die indirekte Verseifung nach der Alkoholextraktion besser als die direkte Verseifung.

5. Bei der vorgeschrittenen natürlichen Fäulnis des Leberbreis, wo verschiedene Fäulnisbakterien und Schimmelpilze durcheinander wachsen, vermehren sich die Petrolätherextrakte beträchtlich. Dieselben sind indessen tief braunschwarz gefärbt und enthalten neben hohen Fettsäuren verschiedene Beimengungen. Die bloße Vermehrung der Petrolätherextrakte bei der vorgerückten natürlichen Fäulnis gibt uns keinen Beweis für die Fettneubildung. Um das Verhalten des Leberfettes gegen Fäulnisbakterien festzustellen, gewinnt man wohl nur dann einen richtigen Aufschluß, wenn man mit Reinkulturen der Saprophyten arbeitet.

Zum Studium der Atmungsenzyme der Pflanzen.

Von

W. Zaleski.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität Charkow.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Samen einiger Pflanzen, besonders die der Erbsen, stellen ein geeignetes Objekt zum Studium der Atmungsfermente dar.[1]) So scheiden die gepulverten und dann durch Äther oder Aceton abgetöteten Erbsensamen nach dem Befeuchten derselben mit Wasser eine bedeutende Menge Kohlensäure aus. Je nach der Menge und Wirkungsdauer von Aceton auf diese Samen bekommt man Präparate von verschiedener Qualität. Um die abgetöteten Objekte mit wirksamen Atmungsfermenten zu erhalten, ist es notwendig, den Charakter der Wirkung verschiedener organischer Lösungsmittel, die gewöhnlich zu diesem Zweck dienen, auf die Pflanzen und Atmungsfermente derselben näher zu untersuchen.

Buchner und seine Mitarbeiter[2]) haben sich zur Darstellung von Dauerhefe einiger organischer Lösungsmittel bedient. Es ergab sich, daß Aceton das geeignetste Mittel zur Gewinnung von Dauerhefe darstellt, während Äthylalkohol Zymase schädigt und Methylalkohol diese vernichtet.

Die höheren Pflanzen sind weniger als die Hefe zur Darstellung von Dauerpräparaten geeignet. Um die Pflanzen mit organischen Lösungsmitteln rasch zu töten und Präparate mit wirksamen Atmungsfermenten aus denselben zu gewinnen, müssen wir zuvor ihre Struktur zerstören. Die Zerstörung der Struktur wirkt aber verschieden auf die CO_2-Ausscheidung der Pflanzen.

Zuerst hat Godlewski[3]) die Meinung ausgesprochen, daß die Zerstörung der cellularen Struktur die Atmungsenergie der Samen ver-

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, diese Zeitschr. 27, 1910.

[2]) E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903.

[3]) Godlewski und Polzenius, Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie 1901.

mindert. Der Verfasser schreibt, daß „die Zerstörung der Zellenstruktur der Samen durch Zerreiben derselben eine nahezu vollständige Sistierung der Kohlensäurebildung zur Folge hatte“, und weiter: „Die intramolekulare Atmung der Erbsensamen ist an die Zellenstruktur derselben gebunden.“ In den Versuchen des Verfassers befanden sich die zerriebenen Samen unter dem Wasser, wodurch die Atmungsenergie derselben sehr gering war. Wenn wir aber die gepulverten Erbsensamen mit Wasser befeuchten, so atmen sie in der Luft und im Wasserstoff sehr energisch und sogar stärker als intakte Objekte.[1]) Wir haben gezeigt, daß verschiedene Samen nach dem Zerreiben derselben bedeutend mehr Kohlensäure als die unversehrten ausscheiden.[2]) Dasselbe zeigen auch unsere Versuche mit einigen Knollen. Dagegen atmen andere Objekte, besonders die Keimpflanzen und Blätter nach der Zerstörung ihrer Struktur schwächer, und manchmal scheiden sie sehr geringe Mengen Kohlensäure aus. Überhaupt kann man sagen, daß die Zerstörung der Struktur am stärksten die Atmung derjenigen Objekte vermindert, die im Zustande tätigen Lebens sich befinden oder wasserreich sind. Noch stärker wird die Kohlensäureausscheidung zerriebener Objekte nach dem Behandeln derselben mit organischen Lösungsmitteln, wie Aceton und Alkohol vermindert, und manchmal hört diese ganz auf. Zwar können wir die Pflanzen durch Trocknen entwässern, aber dieses Verfahren ist nicht immer brauchbar. So schädigt das Trocknen einiger Knollen und besonders der gequollenen Samen die Atmungsenergie derselben nicht, da diese nach dem Pulverisieren und Befeuchten mit Wasser sehr energisch CO_2 ausscheiden. Dagegen wirkt das Trocknen schädlich auf die Kohlensäurebildung der turgescenten, wasserreichen Organe, die im Zustande tätigen Lebens sich befinden. So scheiden, wenn wir die getrockneten Pflanzen durch Einweichen derselben im Wasser auf den früheren Wassergehalt bringen oder nach dem Pulverisieren mit Wasser befeuchten, dann in vielen Fällen eine geringe Menge Kohlensäure aus. Dieses Resultat hängt nicht von der Strukturzerstörung der Pflanzen ab, und ich habe manchmal beobachtet, daß die getrockneten, pulverisierten und erfrorenen Pflanzen gleich stark atmen. Mann kann vermuten, daß das Abtöten der turgescenten Pflanzen durch Trocknen oder Erfrieren die Kohlensäureausscheidung derselben vermindert, aber dann wäre es unverständlich, warum das Abtöten der Samen vermittels Erfrieren oder Aceton zu anderen Resultaten führt. Ich denke, daß hier auch andere Momente eine wichtige Rolle spielen.

Es ist sehr möglich, daß die Pflanzen während ihres tätigen Lebens einen geringen oder keinen Vorrat an Atmungsfermenten haben, da die Bildung und der Verbrauch derselben Hand in Hand gehen. Zugunsten dieser Vermutung sprechen meine Versuche mit einigen Pflanzen, die zeigen, daß während des Hungers derselben eine Vermehrung der Atmungs-

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.

[2]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.

fermente stattfindet.[1]) Außerdem spielen dabei der Vorrat an entsprechendem Atmungsmaterial sowie das Medium eine wichtige Rolle.

Alles spricht dafür, daß die turgescenten, wasserreichen Pflanzen zur Herstellung von Dauerpräparaten wenig geeignet sind.

Dagegen sind die Samen zur Darstellung von Dauerpräparaten brauchbar. Die Samen sind wasserarm und atmen nach der Zerstörung ihrer cellularen Struktur sehr energisch. Außerdem enthalten die Samen einen gewissen Vorrat an den Atmungsfermenten. Wie unsere Versuche zeigen, können wir aus den in bestimmten Mineralsalzlösungen eingeweichten Samen nach dem Trocknen und Pulverisieren derselben sehr energisch atmende Präparate gewinnen.[1]) In diesem Falle aktivieren wir die Profermente oder vermehren vielleicht die Menge der Atmungsenzyme.

Zu unserem Zweck sind besonders diejenigen Samen geeignet, in denen anaerobe Prozesse stark hervortreten, z. B. die Erbsensamen. Das hängt wahrscheinlich davon ab, daß die Zerstörung der Struktur die Sauerstoffabsorption stark vermindert. Ich habe in Gemeinschaft mit A. Reinhard gezeigt,[2]) daß die Zerstörung der cellularen Struktur verschiedener pflanzlichen Objekte die Sauerstoffabsorption vermindert und sogar in denjenigen Fällen, in denen die Kohlensäureausscheidung gesteigert wird. Es gehen dabei oft die Oxydationsprozesse ohne Kohlensäurebildung vor sich. Wenn sogar gleich nach der Strukturzerstörung die energische Sauerstoffabsorption stattfindet, so fällt diese dann schnell ab.

Nach der Methode von Buchner und seinen Mitarbeitern[3]) wird die Hefe rasch vermittels Aceton oder Alkohol abgetötet, da sie Wasser enthält. Das ruhende, wasserarme Protoplasma kann resistenter sein. Kurzwelly[4]) und Schubert[5]) haben gezeigt, daß exsiccatortrockene Samen nicht nur bei Zimmertemperatur, sondern auch bei höheren Temperaturen außerordentlich resistent gegen Alkohol, Äther usw. sind, da sie in solchem Medium sehr lange Zeit ihre Lebensfähigkeit nicht einbüßen. Dieses Resultat erklärt sich aber nicht durch die Resistenz des Protoplasts, sondern durch die Undurchlässigkeit der Samenschalen für die oben genannten Stoffe.

---

[1]) Über diese Versuche werde ich später berichten.

[2]) Noch nicht veröffentlichte Arbeit.

[3]) E. Buchner, H. Buchner und Hahn, l. c.

[4]) Kurzwelly, Jahrb. d. wiss. Bot. 38, 1903.

[5]) Schubert, Flora 100, 1910.

Bevor wir zu unseren Versuchen übergehen, wollen wir auf Grund der vorhandenen Literatur die Wirkung organischer Lösungsmittel auf die Zellen und Atmungsfermente derselben berühren.

Die organischen Lösungsmittel, wie z. B. Äther, Alkohol, Aceton und Chloroform, wirken, indem sie in die Zellen eindringen und diese töten, direkt auf die Atmungsfermente oder üben auf diese einen indirekten Einfluß aus. Über die direkte Wirkung dieser Substanzen auf die Atmungsfermente wissen wir sehr wenig und hauptsächlich über die Zymase der Hefe.[1]) Der indirekte Einfluß dieser Stoffe kann aber sehr verschieden sein.

Die organischen Lösungsmittel zerstören die normale Struktur der Zellen, da sie die Lipoide lösen und Eiweißstoffe gerinnen machen, wodurch die Eigenschaften der plasmatischen Membranen verändert werden, die aus Eiweißstoffen oder Lipoiden bestehen oder eine Art Mosaik darstellen, deren Steinchen teils aus Lipoiden, teils aus plasmatischem Material zusammengesetzt sind. Durch die Veränderung der Struktur der Membranen des Plasmas und der Vacuolen wird die Lokalisation der chemischen Reaktionen in den Zellen gestört, wenn eine solche wirklich durch diese Momente bedingt ist, wie es einige Forscher annehmen. So sagt z. B. Buchner[2]): „Die Zelle besteht aus verschiedenen getrennten Werkstätten, deren Agenzien und Produkte, solange das Leben der Zelle dauert, voneinander getrennt bleiben. denn sonst würden sie sich gegenseitig angreifen. Es genügt die Annahme, daß die einzelnen Werkstätten getrennt sind, z. B. durch mit Cholesterin imprägnierte Grenzschichten des Protoplasts.“ Die Zerstörung der Struktur der Zellen unter der Wirkung der oben genannten Stoffe beschränkt sich nicht nur auf die Membranen derselben. Der Hauptanteil des Protoplasts besteht aus den Eiweißstoffen und Lipoiden, die verschiedene Stoffe adsorbieren und lockere oder fester gefügte Verbindungen mit diesen und wahrscheinlich miteinander geben. Mit Recht sagt Palladin[3]), daß „die Lipoide als ein Zement funktionieren, der im lebenden Protoplasma die verschiedensten Stoffe zu einem ganzen verbindet“. Weiter sind die Lipoide Lösungsmittel für viele Stoffe und dienen zur Herstellung der kolloidalen Lösungen. Indem wir die Lipoide aus den Zellen herauslösen oder die Eiweißstoffe gerinnen machen, stören wir dadurch die Lokalisation der chemischen Reaktionen und verändern die physikalischen Eigenschaften des Mediums, in dem Fermente wirken.

Weiter vermuten verschiedene Forscher, daß die Lipoide direkt auf die Fermente wirken. So sagt z. B. Abderhalden[4]): „Es ist wohl möglich, daß das Lecithin und die übrigen zur Gruppe der Phosphatide gehörenden Verbindungen in den tierischen Zellen Aktivatoren sind,

[1]) Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, 1910. — Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkungen, 1910.

[2]) E. Buchner und M. Hahn, l. c.

[3]) Palladin und Stanewitsch, diese Zeitschr. 26, 1910.

[4]) Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chem., 1909.

und zwar vielleicht der intercellularen Fermente." Auch weisen andere Forscher darauf hin, daß die Lipoide verschiedene Fermente aktivieren und paralysieren können.[1])

Einige Forscher, z. B. Fränkel und Dimitz[2]), nehmen an, daß die Lipoide, nämlich die ungesättigten Phosphatide, sich an den Oxydations- und Reduktionsprozessen der Zellen beteiligen.

In der unlängst erschienenen Arbeit weisen Palladin und Stanewitsch[3]) darauf hin, daß die Lipoide einen großen Einfluß auf die Atmung der Pflanzen haben. Die Verfasser haben Weizenkeime mit verschiedenen Extraktionsmitteln extrahiert und nach der Entfernung des Extraktors an der Luft getrocknet. Dann wurden die extrahierten Weizenkeime $^1/_2$ Stunde lang in Wasser eingeweicht und in den Atmungsapparat zur Bestimmung der von ihnen ausgeschiedenen Kohlensäure eingeführt. Die Verfasser sagen, daß „ein Extraktionsmittel um so schädlicher auf die Kohlensäureausscheidung der abgetöteten Pflanzen einwirkt, je mehr Lipoide und Phosphor es letzteren entzieht". Am wenigsten vermindert die Kohlensäureausscheidung der Weizenkeime die Extraktion derselben mit Toluol und Aceton, während Chloroform, Äther und besonders Äthylalkohol nachteiliger in diesem Falle einwirken.

Da aber die oben genannten Forscher die abgetöteten Weizenkeime in Wasser eingeweicht haben, so wurde dadurch die Exosmose aus den Zellen nicht vermieden, und daher bleibt es unbekannt, in welcher Weise die Lipoidextraktion in diesem Falle wirkt. Das Einführen von Toluol in den Atmungsapparat beseitigt den Parallelismus zwischen der Lipoidextraktion und Kohlensäureausscheidung. Ob dieses Resultat von Toluolzusatz oder von anderen Ursachen abhängt, das bleibt unbekannt. Weiter ist es sehr schwer, durch Trocknen an der Luft aus den extrahierten Keimen die verschiedenen Extraktionsmittel vollständig zu entfernen, die wahrscheinlich die Benetzbarkeit der Keime und daher auch Exosmose einiger Substanzen ins Wasser in verschiedenem Grade beeinflussen. Über die Rolle der Exosmose in diesem Falle spricht ein folgender Versuch, der von mir ausgeführt wurde.

Versuch 1.

Es wurden einige Portionen der exsiccatortrockenen Weizenkeime zu je 7 g mit Äther (wasserfrei), Aceton, Methyl- und Äthylalkohol (99,8 $^0/_0$) extrahiert. Die Extraktion dauerte 4 Tage, und im Verlaufe dieser Zeit wurden die Keime mit je 70 ccm des betreffenden Lösungsmittels übergossen, das nach 2 Tagen abgegossen und durch dieselbe Menge des frischen Extraktionsmittels ersetzt wurde. Dann wurden die Keime, nach der Entfernung der Flüssigkeit, mit Papier abgetrocknet und zuerst an der Luft

---

[1]) Literatur bei Centanni, diese Zeitschr. 29, 1910.

[2]) Fränkel und Dimitz, Wiener klin. Wochenschr. 1909, 51.

[3]) Palladin und Stanewitsch, l. c.

bei Zimmertemperatur und nachher im Thermostaten bei 36 bis 37° getrocknet. In anderen Fällen wurden die mit Aceton und Alkohol extrahierten Keime noch mit je 40 ccm Äther 24 Stunden lang extrahiert, mit diesem ausgewaschen und dann in derselben Weise getrocknet. Außerdem wurden andere Portionen der Weizenkeime (7 g) 4 Tage lang mit Äthylalkohol befeuchtet (15 ccm) und dann sorgfältig mit Äther ausgewaschen und getrocknet. Dann wurden die in der oben beschriebenen Weise extrahierten Keime mit 8 bis 10 ccm destillierten Wassers durchfeuchtet und auf Papier in den Atmungsapparat hineingebracht. Die Keime saugen sehr schnell Wasser auf. Gleichzeitig wurde die Kohlensäureausscheidung der gepulverten Keime (7 g) bestimmt.

	CO_2 pro $1^1/_2$ Std. mg
Kontrollkeime gepulvert	7—8
Ätherkeime	14,5—17,2
Acetonkeime	16,5
„ mit Äther ausgewaschen	15,5
Äthylalkoholkeime	7,5
„ mit Äther ausgewaschen	8,5
„ mit Alkohol befeuchtet und mit Äther ausgewaschen	5
Methylalkoholkeime mit Äther ausgewaschen	0

Zuerst sehen wir, daß die mit Äthylalkohol (99,8%) extrahierten Keime eine ziemlich bedeutende Menge Kohlensäure ausscheiden, während in den Versuchen von **Palladin** und **Stanewitsch** keine Kohlensäurebildung in diesem Falle stattfindet. Weiter bemerken wir keinen Unterschied zwischen der Energie der Kohlensäureausscheidung der Aceton- und Ätherkeime. Die mit Äther und Aceton extrahierten Keime scheiden viel mehr CO_2 als die Alkoholkeime aus, während Methylalkoholextraktion die Kohlensäurebildung hemmt. Ich muß aber bemerken, daß die Extraktion nicht vollständig war, da nur die Ätherflüssigkeit ganz farblos war, während die letzten Aceton- und Alkoholextrakte noch schwach gelbe Farbe hatten, obwohl ich mich zur Extraktion von 7 g Weizenkeimen 140 ccm des Extraktionsmittels bediente, während die oben genannten Forscher für die von 100 g Weizenkeimen nur 800 ccm des Lösungsmittels

genommen hatten. Das hängt wahrscheinlich davon ab, daß die Qualität der Weizenkeime sehr verschieden war. In der Tat war die Atmungsenergie der von mir benutzten Keime sehr schwach, während diese in den Versuchen von Palladin und Stanewitsch sehr lebhaft atmeten. Palladin[1]) sagt, daß die Atmungsenergie der Weizenkeime verschiedener Sendungen[2]) erheblich schwankt. Tatsächlich bekommen wir, wenn wir auf Grund der Versuchszahlen verschiedener Forscher die Intensität der Atmung der Keime berechnen, sehr voneinander abweichende Zahlen. So z. B. scheiden 100 g Weizenkeime nach Palladin und Stanewitsch 390, nach N. Iwanoff[3]) 100 bis 127, nach Burlakow[4]) 198 bis 228, nach Kostytschew[5]) 41 bis 71 und nach unseren Bestimmungen 114 bis 170 mg CO_2 pro Stunde aus. Die verschiedene Intensität der Atmung der Keime hängt nicht nur von dem Trocknen und der Aufbewahrungsdauer derselben vor der Absendung, sondern auch von der Menge der versehrten Keime und Verunreinigungen ab.

Die mit Alkohol befeuchteten Keime atmen sehr schwach und wahrscheinlich dadurch, daß Äther schwer den von ihnen aufgenommenen Alkohol daraus entfernt.

Nehmen wir an, daß unsere Keime abgetötet waren, oder daß die Extraktion derselben mit den oben genannten Lösungsmitteln unvollkommen war, so können wir dennoch nicht den Parallelismus zwischen der Menge der extrahierten Lipoide, besonders deren Phosphor- und CO_2-Ausscheidung bemerken, da Aceton- und Ätherkeime gleich stark atmen, obwohl die Phosphatide mehr in Äther löslich sind. Die Verminderung der Kohlensäureausscheidung der extrahierten Keime wird nicht durch die Menge der herausgelösten Stoffe, sondern durch die Qualität derselben bedingt. In einigen Fällen beobachtete ich bei der allmählichen Extraktion der Keime eine gewisse Steigerung der Kohlensäureausscheidung, während in anderen Fällen ein gewisser Parallelismus zwischen CO_2-Bildung und der Menge des Extraktionsmittels und Wirkungsdauer derselben zu bemerken war.

---

[1]) Palladin, Jahrb. f. wiss. Botan. 1910.
[2]) Zürich, Maggi, Stadtmühle.
[3]) N. Iwanoff, Bull. de l'Acad. de Sc. Petersbourg, VI. Ser., 1910.
[4]) Burlakow, Arb. d. Charkower Ges. d. Naturf. 31, 1897.
[5]) Kostytschew, diese Zeitschr. 15, 1909.

Ich will noch einen Versuch anführen, den Herr Jakowleff auf meinen Vorschlag ausgeführt hat.

Versuch 2.

8 g Weizenkeime. Die Extraktion dauerte 5 Tage und wurde 4mal mit je 25 ccm des Extraktionsmittels ausgeführt. Die Versuchsanordnung wie im ersten Versuche. Weizenkeime anderer Sendung.

Extraktionsmittel	CO_2 pro 3. Std. mg
Aceton	58—58
Äther	53—54
Äthylalkohol (99,8 %)	34—35
Chloroform	23—23
Kontrollkeime pulverisiert	30

Auch in diesem Versuche waren nur die Ätherextrakte farblos.

Die interessanten Versuche von Palladin zeigen, daß die Extraktionsmittel in verschiedenem Grade die innere Struktur der Keime zerstören und dadurch die Atmungsenzyme verschieden beeinflussen. In der Tat sehen wir, daß Alkoholkeime gleich stark wie die pulverisierten atmen. Dafür sprechen auch die Extraktionsversuche der pulverisierten Keime. So z. B.

Versuch 3.[1])

Extraktionsmittel	CO_2 pro Stunde mg
Äther 1mal extrahiert	9,5
„ 2 „ „	9,0
„ 3 „ „	10,0
Alkohol 99,8 % 1mal extrahiert	5,5
„ 2 „ „	5,1
„ 3 „ „	5,5
Kontrollkeime pulverisiert	10,0

Alkoholextraktion vermindert die CO_2-Ausscheidung der pulverisierten Keime, während Ätherextraktion die Energie derselben nicht verändert.

Ich will vorläufig keinen allgemeinen Schluß aus unseren Versuchen ziehen, da die Frage über die Wirkungsweise der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsenzyme der Pflanzen

[1]) Dieser Versuch wurde von Herrn Jakowleff ausgeführt.

sehr verwickelt ist. Ich habe die oben beschriebenen Versuche angeführt, da sie über die Untersuchungsmethode der Kohlensäureausscheidung der extrahierten Objekte sprechen.

Meine weiteren Versuche verfolgen einen anderen Zweck. Ich habe mir zur Aufgabe gestellt, die Wirkung verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Samen zu prüfen, um Präparate mit wirksamen Atmungsenzymen zu erhalten. Meine Versuche haben auch noch einen anderen Zweck.

Ich habe vor kurzem gezeigt,[1]) daß nur zweibasische Phosphate die fermentative Kohlensäureausscheidung der Erbsensamen steigern, während andere Mineralsalze diese vermindern, wenn die Konzentration derselben nicht zu gering ist. Da aber die Atmungsfermente in einem sehr komplizierten Medium wirken und da wir zurzeit keine Methoden zum Isolieren dieser Fermente besitzen, so bezweckte ich, das Medium durch die Extraktion der Objekte mit organischen Lösungsmitteln zu verändern, um die Wirkung der Mineralsalze auf die enzymatische Kohlensäureausscheidung wieder zu prüfen.

Da unsere früheren Versuche meistens mit Erbsensamen ausgeführt waren, so bediente ich mich auch jetzt dieses Objekts, das sehr wirksame Atmungsenzyme enthält.

Es ist interessant, daß pulverisierte Erbsensamen im Verlauf einiger Stunden in der Luft und im Wasserstoff gleiche Mengen der Kohlensäure ausscheiden. Da Phosphate die Kohlensäureausscheidung steigern, so beobachten wir in diesem Falle ungeachtet der ausgezeichneten Aeration typische Gärung. Ob dabei auch Alkohol sich bildet, bleibt unbekannt.

Meine in Gemeinschaft mit A. Reinhard[2]) ausgeführten Versuche zeigen, daß weder zweibasische Phosphate, noch andere Mineralsalze, wie KNO_3, $Ca(NO_3)_2$, KH_2PO_4 und $MgSO_4$, in 0,25 bis 1 %iger Lösung die Sauerstoffabsorption der gepulverten Erbsensamen stimulieren. In derselben Weise wirken diese Stoffe auch auf die Sauerstoffabsorption der vorher mit Äther abgetöteten Erbsensamen. Man kann also denken, daß der von Erbsenpulver absorbierte Sauerstoff zu denjenigen Oxydationsprozessen verbraucht wird, die ohne Kohlensäurebildung vor

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard.

[2]) Noch nicht veröffentlichte Arbeit.

sich gehen. So stimulieren zweibasische Phosphate die Peroxydase[1]) und Tyrosinase der Erbsen.[2])

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der von den gepulverten Erbsensamen absorbierte Sauerstoff nicht in den ersten Stunden des Versuches, sondern später zu wirken beginnt, und wenngleich Phosphate die Energie der Sauerstoffabsorption nicht verändern, wissen wir dennoch nicht, welcher Anteil des absorbierten Sauerstoffs zur CO_2-Bildung und welcher zu anderen Oxydationsprozessen verbraucht wird.

Wenn Iwanoff die stimulierende Wirkung der Phosphate auf die Oxydationsprozesse der gepulverten Erbsensamen verneint,[3]) so zeigen dennoch seine Versuche,[4]) daß diese Objekte viel schwächer in Wasserstoff als in der Luft atmen. Diese Erscheinung tritt aber in den lange dauernden Versuchen auf, und daher spricht für die oben geäußerte Vermutung, daß der Sauerstoff nur später zu wirken beginnt. Wir werden gerne Iwanoff beistimmen, wenn er seine Behauptungen durch neue Versuche, nicht aber auf Grund der Analogien mit Hefegärung beweisen wird. In jedem Falle zeigen die gepulverten Erbsensamen in den ersten Stunden des Versuches an der Luft den typischen anaeroben Atmungsprozeß.

Nach diesen Bemerkungen wollen wir zu unseren Versuchen übergehen.

In diesen Versuchen wurde eine bestimmte Menge (20 bis 30 g) der nicht zu fein gepulverten Erbsensamen in Gefäße mit gut geschliffenen Glasstopfen eingeführt und mit einer bestimmten Menge der Extraktionsflüssigkeit übergossen. In anderen Versuchen wurde die Substanz mit einer geringen Quantität der betreffenden Flüssigkeit versetzt, um die Masse nur zu befeuchten und auf diese Weise die Extraktion, wenn nicht aus den Zellen, sondern aus dem Präparat zu beseitigen. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Substanz auf das Filter gebracht und getrocknet oder aufs neue extrahiert. In diesem Falle wurde die Flüssigkeit abfiltriert und die Substanz von neuem mit Lösungsmittel übergossen. Diese Operation wurde 2 bis 4 mal ausgeführt, und jedesmal wurde die auf dem Filter zurückgebliebene Substanz in das Gefäß zurückgebracht.

---

[1]) W. Zaleski und A. Reinhard, l. c.
[2]) Wolff, zit. nach Chem. Centralbl. 1910, I, 19.
[3]) L. Iwanoff, dies Zeitschr. 29, 1910.
[4]) L. Iwanoff, ibid. 25, 1910.

Die befeuchtete oder extrahierte Substanz wurde mit Filtrierpapier getrocknet, an der Luft ausgebreitet und zuletzt im Thermostaten bei 36 bis 50° über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Im ganzen dauerte das Trocknen 2 bis 4 Tage.

Das getrocknete Versuchsmaterial wurde in kleinen Krystallisierschalen mit einer solchen Quantität destillierten Wassers versetzt, daß ein dichter, gleichmäßig befeuchteter Brei sich bildete, den man leicht auf Papier schmieren und in den Atmungsapparat hineinbringen konnte. Die Substanz ist schwer benetzbar, und man muß allmählich unter beständigem Umrühren der Substanz mit dem Spatel Wasser hinzufügen. Nach meinen Bestimmungen ist die stündliche Kohlensäureausscheidung im Verlaufe von 4 Stunden konstant. Ich habe meistens die Kohlensäureausscheidung pro 2 Stunden bestimmt und führe in der vorliegenden Mitteilung nur die stündliche Größe derselben an.

In unseren Versuchen können wir daher die Anwendung des Antiseptikums unterlassen um so mehr, als dieses, z. B. Toluol, die Kohlensäureausscheidung um 45% vermindert.

Iwanoff[1]) hat uns den Vorwurf gemacht, daß wir „leider unter nicht sterilen Bedingungen" die Kohlensäureausscheidung bestimmt hatten. Dem Verfasser ist augenscheinlich ein Mißverständnis unterlaufen, da das vielmehr auf seine als auf unsere Versuche sich bezieht. Unsere Versuche sind die kurzdauernden, während Iwanoff in einigen Fällen ohne Antiseptikumzusatz Weizenkeime 23 Stunden lang im geschlossenen Raume hielt (Tabelle II). Weiter bestimmte Iwanoff die Atmung lebender Erbsensamen, die in einer dünnen Flüssigkeitsschicht 92 Stunden lang sich befanden. In anderen Versuchen bediente sich der Verfasser des Toluols und leitete den Luftstrom sehr lange durch den Atmungsapparat, ohne dabei eine Flasche mit Toluol einzuschalten. Die Versuche von Iwanoff wurden wirklich „leider unter nicht sterilen Bedingungen" ausgeführt.

Über die Arbeit der Enzyme können wir nach der Reaktionsgeschwindigkeit urteilen, und in diesem Falle sind die kurz dauernden Versuche meiner Meinung nach brauchbar, da die Atmungsenzyme sehr empfindlich sind, und da in den lange dauernden Experimenten auch andere Momente hervortreten. So wird z. B. Zymase allmählich durch Endotryptase im Preßsafte der Hefe zerstört.

---

[1]) Iwanoff, diese Zeitschr. 29, 1910.

Versuch 4.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden 24 Stunden lang mit je 70 ccm 99,8 und 92 °/₀ Äthylalkohol extrahiert und dann bei 36° getrocknet.

Alkohol °/₀	CO_2 pro Stunde mg
99,8	6,7
92,0	3,0

Versuch 5 und 6.

Das mit 99,8 °/₀ Äthylalkohol extrahierte Samenpulver wurde 1. mit destilliertem Wasser, 2. mit K_2HPO_4 1 °/₀ und 3. mit KNO_3 1 °/₀ befeuchtet. Es wurden Portionen zu je 30 g genommen.

		CO_2 pro Stunde mg	
H_2O		6,3	5,5
K_2HPO_4	1 °/₀	10,8	12,1
KNO_3	1 °/₀	3,6	3,5

Versuch 7.

Vier Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden in 2 bis 5 Tagen 1 bis 4 mal mit je 70 ccm (im ganzen 70 bis 280 ccm) Äthylalkohol 99,8 °/₀ extrahiert. Zwei andere Portionen wurden 2 bis 5 Tage mit je 15 ccm Alkohol befeuchtet.

Alkohol-extraktionsdauer Tage	Alkohol-menge ccm	CO_2 pro Stunde mg	Alkohol-befeuchtungsdauer Tage	CO_2 pro Stunde mg
2	70	7,5	2	4,5
3	140	6,6	3	5,2
4	210	6,8	4	4,5
5	280	7,6	5	5,0

Versuch 8.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen wurden mit 15 ccm Äthylalkohol 99,8 °/₀ befeuchtet, die zwei anderen aber wurden 2 Tage mit je 70 ccm desselben Lösungsmittels extrahiert. Alle Portionen wurden zuerst bei 36° und dann bei 80° oder über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Extrahiert und im Vakuum getrocknet	6,7
Befeuchtet „ „ „ „	2,5
Extrahiert und bei 80° getrocknet	6,7
Befeuchtet „ „ „ „	2,3

Versuch 9.

Vier Portionen des Pulvers der Erbsensamen zu je 30 g wurden teils mit je 70 ccm Äthylalkohol übergossen, teils mit je 15 ccm desselben befeuchtet. Nach 2 Tagen wurden die befeuchteten Portionen auch mit je 70 ccm Alkohol übergossen. Nach 4 Tagen wurden alle Portionen von Alkohol befreit, zwei dieser Portionen wurden bei 36° getrocknet, die anderen aber wurden sorgfältig mit Äther ausgewaschen, um die Alkoholspuren zu entfernen, und dann in derselben Weise getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Extrahiert	6,2
„ und mit Äther ausgewaschen	6,5
Vorher befeuchtet	3,2
„ „ und mit Äther ausgewaschen	3,4

Versuch 10.

Drei Portionen der gepulverten Samen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 2 bis 5 Tagen 1 bis 4mal mit je 100 ccm Aceton extrahiert. Drei andere Portionen wurden mit je 15 ccm Aceton befeuchtet.

Acetonwirkungsdauer Tage	Acetonmenge ccm	CO_2 pro Stunde mg	Befeuchtungsdauer Tage	CO_2 pro Stunde mg
2	200	11,0	2	8,0
4	300	8,5	4	8,0
5	400	9,0	5	7,0

Versuch 11.

Vier Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 4 Tagen mit je 15 ccm Aceton befeuchtet. Zwei dieser Portionen wurden dann bei 36 und bei 50° getrocknet, die anderen aber wurden sorgfältig mit Äther ausgewaschen und dann bei denselben Bedingungen getrocknet.

	CO_2 pro Stunde mg
Acetonpulver bei 36° getrocknet	8,0
„ „ 50° „	8,0
„ mit Äther ausgewaschen und bei 36° getrocknet	7,5
Acetonpulver mit Äther ausgewaschen und bei 50° getrocknet	8,5

Versuch 12.

Vier Portionen des Pulvers zu je 30 g wurden mit je 70 ccm Äther (wasserfrei) im Verlaufe von 2 bis 7 Tagen 1 bis 4mal extrahiert. Parallel wurden andere Portionen des Pulvers mit je 15 ccm Äther befeuchtet. Alle Portionen wurden bei 36° getrocknet.

Äther-wirkungsdauer Tage	Menge der Extraktionsflüssigkeit ccm	CO_2 pro Stunde mg	Befeuchtungs-dauer Tage	CO_2 pro Std. mg
2	70	15	2	16
7	70	11,2	—	—
5	210	10,8	5	16
7	280	11,0	7	16

Versuch 13.

Zwei Portionen des Pulvers der Erbsensamen[1]) zu je 20 g wurden 20 Stunden lang mit Äther befeuchtet (8 ccm), und zwei andere wurden 2 Tage mit je 30 ccm Äther extrahiert. Parallel wurde die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers bestimmt.

	CO_2 pro Stunde mg
Lebendes Pulver . .	12
Befeuchtet mit Äther	12
Extrahiert „ „	11

Versuch 14.

Zwei Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden 16 Stunden lang mit je 30 ccm Äther und Aceton extrahiert. Eine Acetonportion wurde außerdem mit Äther

1) Die Samen sind anderer Herkunft.

ausgewaschen. Parallel wurde die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers bestimmt.

	CO_2 pro Stunde mg
Lebendes Pulver	16,3
Äther-Pulver	16—16,3
Aceton-Pulver	16,0
„ „ mit Äther ausgewaschen	16,0

Versuch 15.

Sieben Portionen der gepulverten Erbsensamen zu je 30 g wurden im Verlaufe von 4 Tagen 2mal mit 200 ccm (im ganzen also 400 ccm) der unten bezeichneten Lösungsmittel extrahiert. Eine dieser Portionen wurde mit je 70 ccm Aceton-Äthylalkohol und dann mit Äther extrahiert. Alle extrahierten Portionen wurden zuerst bei 37° und dann bei 50 oder 62° (2 Stunden lang) getrocknet.

Extraktionsflüssigkeit	CO_2 pro Stunde getrocknet bei 50° mg	bei 62° mg
Äther	8,0	9,0
Aceton	7,7	8,7
Chloroform	6,0	5,7
Äthylalkohol 99,8%	6,5	6,5
Aceton, Äthylalkohol, Äther	6,5	6,5
Methylalkohol[1]	keine Kohlensäureauscheidung	
Methylalkohol-Äther[1]	do.	

Wir sehen, daß Methylalkoholextraktion der gepulverten Erbsensamen die Zymase derselben schnell zerstört oder inaktiviert (Versuch 15). Durch Äthylalkoholextraktion wird die Wirksamkeit der Erbsenzymase schon nach 24 Stunden um die Hälfte geschwächt, wobei die Menge des Extraktionsmittels sowie die Wirkungsdauer desselben keine merkliche Rolle spielen, wie Versuch 7 zeigt. Das durch Alkoholextraktion geschädigte Enzym gewinnt seine frühere Energie durch zweibasische Phosphate zurück (Versuch 5 bis 6). Kaliumnitrat

[1]) Die Extraktion dauerte nur 24 Stunden.

in 1 %iger Lösung wirkt schädlich, was unsere früheren Versuche bestätigen. Wenn diese Präparate eine geringe Alkoholmenge enthalten, so übt diese keinen Einfluß auf die Energie der Kohlensäurebildung aus, da wir nach dem Auswaschen des Präparates mit Äther, sowie nach dem Trocknen desselben bei 80° oder im Vakuum dieselbe Zahlen bekommen (Versuch 8 und 9). Die schädliche Alkoholwirkung tritt in denjenigen Versuchen hervor, in denen das Pulver mit einer geringen Quantität dieses Extraktionsmittels befeuchtet wurde, da die aus den Zellen, nicht aber aus dem Präparat herausgelösten Lipoide dieses zurückhalten. Das Trocknen solcher Präparate bei höheren Temperaturen vermindert die Kohlensäureausscheidung noch mehr (Versuch 8). Das sorgfältige Auswaschen des Präparates mit Äther beseitigt auch diese schädliche Wirkung nicht, und daher ist es wahrscheinlich, daß einige von den extrahierten Stoffen sich an der Luft zersetzen und daß die Zersetzungsprodukte derselben, nach dem Befeuchten des Pulvers mit Wasser, nachteilig auf die enzymatische Atmung einwirken. So z. B. vermindert Wasser-Lecithinemulsion (Handelspräparat) die Kohlensäureausscheidung des lebenden Pulvers.

Weniger nachteilig wirkt auf die fermentative Kohlensäureausscheidung der gepulverten Erbsensamen die Extraktion derselben mit Aceton und Äther. Die Steigerung der Acetonmenge bei der Extraktion oder vielmehr das Verlängern der Extraktionszeit bewirkt das allmähliche Absinken der von Erbsenpulver ausgeschiedenen CO_2-Mengen, aber nur bis zu einem gewissen Grade (Versuch 10). Noch deutlicher tritt ein gewisser Parallelismus zwischen Ätherextraktionsdauer des Pulvers und der von diesem ausgeschiedenen CO_2-Menge hervor (Versuch 12). Nach der kurz dauernden Extraktion des Erbsenpulvers mit Aceton und Äther sowie nach dem Befeuchten derselben mit Äther (Versuch 12, 13 und 14) scheidet es gleichviel Kohlensäure wie das lebende aus.

Aus unseren Versuchen ist zu ersehen, daß Äther und Aceton die geeignetsten Mittel zum Abtöten der Samen behufs Gewinnung der Präparate mit wirksamen Atmungsfermenten darstellen. Da wir aber Aceton nicht so leicht wie Äther aus dem Präparat entfernen können, so müssen wir in diesem Falle das Behandeln der Samen mit Äther vorziehen.

Die Wirkung der organischen Lösungsmittel hängt von de Vorbehandlung der Objekte ab. Wir haben schon oben gesehen, daß die abgetöteten Objekte (z. B. Weizenkeime) schwach auf Ätherextraktion reagieren. Der folgende Versuch zeigt die Erscheinung deutlich.

Versuch 16.

Die bei 36° getrockneten und dann fein pulverisierten Spitzen der etiolierten Stengel von Vicia Faba Windsor wurden in zwei Portionen zu je 3,5 g geteilt. Die eine Portion wurde 2 Tage lang mit je 20 ccm Äther (wasserfrei) extrahiert und dann mit Äther gründlich ausgewaschen. Die mit Äther extrahierte Portion wurde zuerst an der Luft und dann im Thermostaten bei 36° getrocknet. Beide Portionen wurden mit Wasser befeuchtet, auf Papier gestrichen und in den Atmungsapparat hineingebracht.

Versuchsdauer Stunden	CO_2 Kontrollportion mg	CO_2 Ätherportion mg
1	8,5	8,7
3	13,0	14,5
4	21,5	23,2

Die Spitzen waren durch Trocknen abgetötet und wir sehen, daß 2tägige Ätherextraktion keinen Einfluß auf die Energie der CO_2-Ausscheidung ausübt. Es ist verständlich, daß der Unterschied zwischen unseren Versuchen und den von Palladin und Stanewitsch nicht nur von den Untersuchungsmethoden, sondern von der Qualität der Keime abhängt. Auch die mechanische Zertrümmerung der Samen stört durch Steigerung einiger Funktionen und durch Ausfall einiger Vorgänge die Lebensharmonie derselben. Ferner tritt die Tätigkeit der Fermente in den Vordergrund, und wir sehen, daß das sog. lebende Pulver gleich stark wie das vermittels Äther abgetötete atmet.

Ich möchte an dieser Stelle nur zwei Versuche anführen, die über die Wirkung der organischen Lösungsmittel auf die Katalase und das Reduktionsvermögen der Gewebe sprechen.

Versuch 17.[1])

Einige Portionen der bei 36° getrockneten Preßhefe zu je 6 g wurden 4 Tage lang mit je 60 ccm Aceton, Äther,

[1]) Dieser Versuch wurde von Fräulein A. Rosenberg ausgeführt.

Methyl- und Äthylalkohol extrahiert. Die extrahierte Hefe wurde an der Luft, hierauf im Thermostaten bei 36° und schließlich in diesem bei 50° getrocknet. Die Alkoholportion wurde vorher mit Äther ausgewaschen. Dann wurden von je einer Portion der extrahierten Hefe 0,5 g abgewogen und mit 50 ccm destillierten Wassers versetzt und abfiltriert. 20 ccm des Filtrates wurden mit einer bestimmten Menge der 3%igen Hydroperoxydlösung versetzt.

Extraktionsmittel	Manometerstand des Quecksilbers nach 20 Minuten mm
Äther	64
Aceton	56
Äthylalkohol 99,8%	50
Methylalkohol	0
Kontrollportion	72

Versuch 18.[1])

Fünf Portionen der bei 36° getrockneten Preßhefe zu je 4 g wurden 2 Tage lang mit je 40 ccm Äther, Aceton, Chloroform, Äthyl- und Methylalkohol extrahiert; dann wurde die extrahierte Hefe zuerst an der Luft und schließlich im Thermostaten bei 36° getrocknet. Dann wurde von je einer Portion der extrahierten Hefe 1,5 g in Probiergläser eingeführt und mit 10 ccm destillierten Wassers und hierauf mit 0,2 ccm 0,05%iger Methylenblaulösung versetzt. Die Flüssigkeit wurde oben mit einer Schicht von Paraffinum liquidum übergossen, um das Methylenblau vom Luftsauerstoff zu isolieren, und darin die Geschwindigkeit der Entfärbung von Methylenblau bestimmt.

Extraktionsmittel	Entfärbungsdauer Minuten
Äther	25
Aceton	32
Chloroform	25
Äthylalkohol	15
Methylalkohol	keine Entfärbung nach 1½ Std.
Kontrollportion	25

[1]) Dieser Versuch wurde von Herrn B. Lubimoff ausgeführt.

Durch Methylalkoholextraktion wird die Hefekatalase vernichtet oder ihre Tätigkeit nur paralysiert, während andere Extraktionsmittel schwach wirken. Die Methylalkoholextraktion hemmt auch das Reduktionsvermögen der Hefe, während andere Extraktionsmittel keinen merklichen Einfluß auf dieses ausüben. Wenn Äthylalkoholextraktion der Hefe die Reduktion von Methylenblau beschleunigt, so hängt das von einer direkten Alkoholwirkung ab. Unsere Versuche zeigen, daß geringe Alkoholmengen die Reduktion des Methylenblau durch Hefe stark beschleunigen. Hingegen verlangsamt Acetonanwesenheit diesen Prozeß.

Weiter hat Korsakow[1]) gezeigt, daß die Extraktion der Weizenkeime mit organischen Lösungsmitteln die Größe der Proteolyse derselben in verschiedenem Grade vermindert. Einige in unserem Laboratorium ausgeführten Versuche zeigen, daß in derselben Weise auch die Verdauungskraft der Handelspräparate von Pepsin durch die vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln beeinflußt wird.

Was die Wirkungsweise der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsfermente betrifft, so sehen wir, daß diese sehr verschieden sein kann.

Wenn eine direkt schädliche und sogar spezifische Wirkung der organischen Lösungsmittel auf die Atmungsenzyme nicht ausgeschlossen ist, so besteht doch ein gewisser Zusammenhang zwischen der Enzymwirksamkeit und den extrahierten Stoffen.

Wir haben schon oben gesehen, daß die Extraktion des Erbsenpulvers mit verdünntem Alkohol mehr als diese mit dem absoluten die Energie der Kohlensäureausscheidung desselben vermindert (Versuch 4). Die schädliche Wirkung des Extraktionsmittels steht in einem gewissen Parallelismus mit der Wasserlöslichkeit desselben. Es scheint also, daß die Substanzen der wässerigen Phase mehr als die Lipoide die Wirksamkeit der Atmungsenzyme beeinflussen. Die Natur dieser Substanzen sowie der Charakter des Einflusses derselben auf die Atmungsenzyme bleiben unbekannt. Wenn das Erbsenpulver nach Alkoholextraktion weniger Kohlensäure ausscheidet, so gewinnt dieses

---

[1]) Korsakow, diese Zeitschr. 28, 1910.

seine frühere Energie durch zweibasische Phosphate zurück, und man könnte daher eine solche stimulierende Wirkung auch den extrahierten Stoffen zuschreiben. Wenn aber durch Methylalkoholextraktion des Erbsenpulvers die Kohlensäureausscheidung sistiert wird, so spricht diese Tatsache dafür, daß Methylalkohol das Enzym zerstört oder die für die Wirksamkeit desselben unentbehrlichen Stoffe, z. B. Kofermente, extrahiert.

Die Atmungsfermente als Endoenzyme sind an den Protoplast der Zellen gebunden und werden nach der Zerstörung dieser Bindung freigegeben, und da sie sehr empfindlich sind, so werden sie je nach dem Charakter des Mediums in verschiedenem Grade abgeschwächt. Besonders sind die Atmungsenzyme in der Lösung empfindlich, wie wir oben in den Versuchen mit Weizenkeimen gesehen haben.

Untersuchungen über den Blutzucker.

IX. Mitteilung.

Weitere Beiträge zur Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker.

Von

P. Rona und A. Döblin.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Untersuchungen von Michaelis und von einem von uns (R.) haben sicher ergeben, daß die roten Blutkörperchen Zucker enthalten,[1]) und ferner, daß zwischen dem Zucker der Blutkörperchen und dem des Serums ein Austausch stattfinden muß, der aber nicht oder nur selten zu einem vollkommenen Ausgleich des Zuckergehaltes in und außerhalb der Blutkörperchen führt. Ein Ausdruck dieser Tatsachen ist der hohe Zuckergehalt im Gesamtblut bei Hunden mit alimentärer Glykämie (z. B. einmal 0,418, in einem anderen Falle 0,473°/₀ bei einem Zuckergehalt im Plasma von bzw. 0,457 und 0,518°/₀), ferner der hohe Blutzuckerwert bei Diabetes mellitus, wie er von Hollinger und Michaelis und Rona in vielen Fällen konstatiert werden konnte. Mit diesem Befund war es jedoch schwer vereinbar, daß von einer Reihe von Forschern im Experiment außerhalb des Organismus die Blutkörperchen für Traubenzucker impermeabel gefunden worden sind. Die Untersuchungen von Hamburger, Gryns, Hedin u. a. führen den

---

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 16, 60, 1909; 18, 375, 1909. Vgl. auch Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

Beweis hierfür nur indirekt, indem sie die Undurchlässigkeit der Blutkörperchen aus gewissem Verhalten derselben in zuckerhaltigen Lösungen folgern. Frühere an gewaschenen Blutkörperchen angestellte Versuche von Michaelis und Rona[1]) sprachen auch für die Impermeabilität, während in Versuchen am Gesamtblut die Möglichkeit eines teilweisen Eindringens des Zuckers in die Blutkörperchen zugegeben werden mußte. Die damaligen Versuche in dieser Richtung waren jedoch nicht vollkommen entscheidend, weil für die Menge der Blutkörperchen nur willkürlich angenommen wurde, daß sie 33 Vol.-$^0/_0$ des Gesamtblutes betrüge.

Die Versuche wurden nun wieder aufgenommen und in der Weise verfahren, daß zunächst die Zuckerverteilung im frischen, mit FNa versetzten menschlichen Blute festgestellt und gleichzeitig zu einem anderen Teil desselben Blutes eine konzentrierte (ca. 15$^0/_0$ige) Traubenzuckerlösung hinzugefügt wurde, bis zu einem Gehalt des Blutes an Traubenzucker von 0,3 bis 0,5$^0/_0$. Nach gründlichem Vermischen — etwa 1 bis 2 Minuten nach dem Zuckerzusatz — wurde dann die Zuckerverteilung wieder festgestellt. Den Gehalt an Blutkörperchen in Vol.-$^0/_0$ bestimmten wir mittels eines Hedinschen Hämatokriten vor und nach dem Zuckerzusatz und berechneten aus den experimentell erhaltenen Daten den Zuckergehalt der Blutkörperchen. Diese berechneten Werte sind in der 3. Kolumne der Tabelle angegeben. Die Zuckerbestimmung erfolgte polarimetrisch nach vorheriger Enteiweißung mittels kolloidalen Eisenhydroxyds nach der Methode von Michaelis und Rona.

Die Versuchsergebnisse sind in der nebenstehenden Tabelle niedergelegt.

Die Volumprozente an Blutkörperchen betragen in den Fällen 1 bis 3 vor dem Zuckerzusatz 38, nach dem Zuckerzusatz bzw. 32, 32 und 35. In den Fällen 4 und 5 (eine stark anämische Patientin) fanden sich 25$^0/_0$ an roten Blutkörperchen.

Aus den Versuchen geht nun eindeutig hervor, daß der Zuckerzusatz zu dem Blute sofort eine Erhöhung der Zuckerwerte der Blutkörperchen veranlaßt hat, diese also unter

[1]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. 18, 514, 1909.

den angegebenen Bedingungen für Zucker durchgängig sind; ferner aber auch, daß ein vollkommener Ausgleich nicht statthat. In keinem der Versuche war der Zuckergehalt im Plasma und in den Blutkörperchen ganz gleich geworden. Daß dieser Ausgleich auch nach 24 Stunden nicht erfolgt, zeigen frühere Versuche in der erwähnten Arbeit von Michaelis und Rona. Hier wurde bei Zusatz von Zucker zu Hundeblut (mit FNa) nach 24stündigem Stehen gefunden: in einem Falle im Plasma 0,626 °/₀ Zucker, im Gesamtblut 0,574 °/₀, in einem zweiten im Plasma 1,22 °/₀ Zucker, im Gesamtblut 0,869 °/₀. — Auch diese Tatsache steht mit den im lebenden Organismus beobachteten Verhältnissen in gutem Einklang.

		Zuckergehalt		
		im Gesamt-Blut °/₀	im Plasma °/₀	in den roten Blutkörperchen °/₀
Fall 1 Mensch	a) sofort	0,094	0,098	0,089
	b) nach Zuckerzusatz	0,375	0,401	0,322
Fall 2 Mensch	a) sofort	0,128	0,175	0,056
	b) nach Zuckerzusatz	0,308	0,356	0,208
Fall 3 Mensch	a) sofort	0,076	0,097	0,066
	b) nach Zuckerzusatz	0,339	0,392	0,243
Fall 4 Mensch	nach Zuckerzusatz	0,437	0,478	0,316
Fall 5 Mensch	nach Zuckerzusatz	0,386	0,436	0,240

Die an geschlagenem Blut angestellten Versuche führten im wesentlichen zu dem gleichen Ergebnis; auch hier konnte, einen Versuch ausgenommen (vgl. Fall 10), ein Eindringen von Zucker in die Blutkörperchen nachgewiesen werden. Es hat aber den Anschein, als ob die Permeabilität unter diesen Bedingungen beschränkter wäre; die von den Blutkörperchen aufgenommene Menge Zucker war in einer Anzahl dieser Versuche im Vergleich zu der in den oben erwähnten Fällen aufgenommenen bedeutend geringer. Dies deutet möglicherweise auf eine Rolle des Fibrinogens bei dem Zuckeraustausch zwischen den Blutkörperchen und seinem Medium, doch konnten

verschiedene, zur Klärung der hier obwaltenden Verhältnisse angestellte Versuche bis jetzt keine Entscheidung bringen. Wir müssen uns daher zunächst mit der Konstatierung der Tatsache begnügen, daß eine Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker auch im geschlagenen Blut nachzuweisen ist. In den Fällen, in denen die Blutkörperchen erst nach Zuckerzusatz zuckerhaltig gefunden wurden, wird man möglicherweise eine durch die hohe Zuckerkonzentration veranlaßte gesteigerte Permeabilität annehmen müssen. Auch diese Verhältnisse finden in unseren Versuchen an Hunden mit alimentärer Glykämie ein Analogon.

Im einzelnen ergaben die Versuche folgende Befunde:

Fall 6. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48 vor, 40 nach dem Zuckerzusatz.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,072	1,106	0,035
b) nach Zuckerzusatz	0,289	0,384	0,147

Fall 7. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 40.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,049	0,099	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,397	0,554	0,16

Fall 8. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,101	0,121	0,08
b) nach Zuckerzusatz	0,452	0,565	0,32

Fall 9. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 40.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,060	0,099	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,535	0,582	0,46

Fall 10. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 38.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,061	0,046	0,08
b) nach Zuckerzusatz	0,248	0,352	0,08

Fall 11. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 48.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,048	0,090	0,00
b) nach Zuckerzusatz	0,451	0,527	0,37

Fall 12. Blut vom Menschen, defibriniert.
Vol.-% Blutkörperchen: 38.

	Zuckergehalt		
	im Gesamt-Blut %	im Serum %	in den roten Blutkörperchen %
a) sofort	0,113	0,164	0,03
b) nach Zuckerzusatz	0,420	0,581	0,15

Durch den Nachweis der Permeabilität der Blutkörperchen für Traubenzucker unter den geschilderten Bedingungen ist dem Vorgange des Zuckeraustausches zwischen Blutkörperchen und Plasma das Rätselhafte genommen. Auch der Ablauf der

Glykolyse ist dem Verständnis näher gerückt. Bekanntlich fehlt im Plasma das glykolytische Ferment, und nach der alten Anschauung sollte wiederum den Blutkörperchen der Zucker fehlen. Der Widerspruch, der dem Verständnis der Glykolyse daraus erwächst, ist nun durch diese und unsere früheren Untersuchungen über diesen Gegenstand behoben. Freilich müssen noch die Bedingungen der teilweisen Permeabilität, wie auch das Verhalten der gewaschenen Blutkörperchen näher studiert werden.

Auf die bemerkenswerte Schrumpfung der Blutkörperchen in dem zuckerhaltigen Medium in mehreren Fällen — wie dies aus den Hämatokritzahlen (vgl. Fall 1 bis 3) zu ersehen ist — gehen wir anläßlich dieser Untersuchung nicht ein, da sie mit der hier erörterten Frage nicht direkt zusammenhängt und die Zuckerwerte der Blutkörperchen nur unwesentlich (und im Sinne eines niedrigeren Zuckergehaltes) verschiebt.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß die roten Blutkörperchen in ihrem natürlichen Medium für Traubenzucker durchgängig sind und ein Widerspruch zwischen der Beobachtung am lebenden Organismus und dem Experiment in vitro nicht besteht.

Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime.

Von

Kiyohisa Yoshimura.

(Aus dem Universitätslaboratorium für Nahrungsmittelchemie in Halle a. S.)

(Eingegangen am 26. Januar 1911.)

I. Die Aminoverbindungen in Malzkeimen.

In einer Arbeit über die Malzkeime hat E. Schulze[1]) bereits berichtet, daß aus Malzkeimen wohl Cholin und Betain, dagegen Arginin und Asparagin trotz aller darauf verwendeten Mühe nicht isoliert werden konnten.

Léger[2]) hat aus Malzkeimen das Alkaloid Hordenin isoliert und untersucht. Es interessierte mich, die Isolierung von Basen, besonders Hexonbasen, sowie Cholin, Betain, Vernin usw. zu wiederholen und die Frage, ob Asparagin in Malzkeimen gänzlich fehlt, zu prüfen; denn es wäre ein gelegentliches Vorkommen hier nicht ausgeschlossen.

Ich konnte nun Histidin, Cholin und Betain, jedoch nicht Arginin, Vernin und Asparagin isolieren.

Die Malzkeime, die für diese Untersuchung benutzt wurden, hatten folgende Zusammensetzung:

Wasser	7,170 %
Trockensubstanz	92,830 %

---

[1]) E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 73, 1908.

[2]) Léger, Compt. rend. 142, 108; 143, 234 und 916; 144, 208.

In 100 Teilen Trockensubstanz:

Gesamt-Stickstoff		3,824
Eiweiß-Stickstoff		2,100
Ammoniak-Stickstoff		Spur
Nichteiweiß-Stickstoff		1,724
Davon	durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	0,367
	Stickstoff in anderer Form	1,357
Gesamt-Phosphorsäure		1,185
In Wasser lösliche Phosphorsäure		0,836

Mithin in Prozenten des Gesamt-Stickstoffs:

Eiweiß-Stickstoff		54,93
Ammoniak-Stickstoff		Spur
Nichteiweiß-Stickstoff		45,07
Davon	durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	9,60
	Stickstoff in anderer Form	35,47

Isolierung der organischen Basen.

1 kg lufttrockene zerkleinerte Malzkeime wurde mit heißem Wasser extrahiert und durch ein Tuch koliert; die vereinigten Extrakte wurden mit Bleiessig versetzt und nach 12 Stunden Stehen filtriert. Das Filtrat wurde durch Schwefelwasserstoff entbleit, mit so viel Schwefelsäure angesäuert, bis die Flüssigkeit ungefähr 5% davon enthielt, und endlich mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde nach dem Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure in bekannter Weise mittels Barythydrat zersetzt. Die dabei erhaltene, vom Ammoniak befreite Basenlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert und mit Silbernitrat in mäßigem Überschuß versetzt, wobei ein brauner Niederschlag entstand, der etwa vorhandene Purinbasen enthalten mußte.

A. Die durch Silbernitrat und Barythydrat fällbaren Basen.

Zur Mutterlauge vom Sibernitratniederschlag wurden Silbernitrat und Barythydrat in mäßigem Überschuß zugesetzt. Der dabei entstandene dunkelbraune Niederschlag, der möglicherweise Histidin und Arginin enthalten konnte, wurde nach dem Auswaschen mit verdünntem Barytwasser, unter Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelsilber wurde, nach dem Konzentrieren, mittels Baryts von der Schwefelsäure befreit, durch Kohlensäure der überschüssige Baryt entfernt und endlich im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedunstet. Die so gewonnene alkalische Flüssigkeit wurde, nach der Sättigung mit Kohlensäure, mit einer Quecksilberchlorid-

lösung versetzt, der entstandene Quecksilberchloridniederschlag durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde im Vakuum eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich prismatische Krystalle in sehr kleiner Menge ausschieden, die mit einer alkalischen Lösung von Diazobenzolsulfosäure die Paulysche Reaktion lieferten.

Um etwaige Spuren von Arginin zu entdecken, wurde das Filtrat vom oben erwähnten Quecksilberchloridniederschlag durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und das vorhandene Chlor durch Silbernitrat entfernt.

Zum Filtrat wurden Silbernitrat und Barythydrat in mäßigem Überschuß zugesetzt, der dabei entstandene Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert, im Vakuum eingeengt und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich aber nichts ausschied. Weiter versuchte ich, Spuren von Arginin nachzuweisen, jedoch gelang es mir ebensowenig wie E. Schulze.

B. Die durch Silbernitrat und Barythydrat nicht fällbaren Basen.

Das Filtrat vom Silbernitrat- und Barythydratniederschlag wurde nach dem Entfernen des Silbers durch Salzsäure und des Baryts durch Schwefelsäure, mit Schwefelsäure stark angesäuert und dann mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in üblicher Weise durch Barythydrat zersetzt.

Die so erhaltene freie Basenlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert, langsam eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich farblose Krystalle ausschieden, die sich nach völligem Austrocknen durch Behandeln mit kaltem absolutem Alkohol in folgende zwei Fraktionen trennen ließen.

1. Die in absolutem Alkohol lösliche Fraktion.

Zur alkoholischen Lösung wurde eine alkoholische Lösung von Quecksilberchlorid zugesetzt, hierbei schied sich ein schwerer weißer Niederschlag aus, der im Schmelzröhrchen erhitzt bei 240° C (unkorr.) sich zersetzte.

Der Quecksilberchloridniederschlag wurde im Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt; die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand im Vakuumexsiccator vollständig getrocknet und dann mit ganz wasserfreiem Alkohol behandelt. Die so erhaltene Lösung wurde wieder eingedunstet, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, unter Zusatz von Platinchloridlösung langsam verdampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich allmählich das Platindoppelsalz als orangefarbige Tafeln ausschied, die in kaltem Wasser leicht, in Alkohol fast unlöslich waren. Die Ausbeute betrug ca. 0,4 g. Im Capillarrohre erhitzt, zersetzt es sich bei 235 bis 240° C (unkorr.).

0,1501 g Substanz ergaben . . . . 0,04755 g Pt

	Gefunden:	Berechnet für Cholinplatinchlorid: $[(C_5H_{14}NO.Cl)_2.PtCl_4]$:
Platin	31,68 %	31,84 %

Zur weiteren Identifizierung des Cholins wurde ein Teil des Platinates mittels Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelplatin nach dem Abdampfen in das Pikrat übergeführt. Dasselbe schied sich als gelbe glänzende Platten oder Prismen aus, die im Wasser sehr leicht löslich waren und im Schmelzröhrchen sich bei ca. 240° C (unkorr.) zersetzten.

2. Die in absolutem Alkohol unlösliche Fraktion.

Den in kaltem absolutem Alkohol unlöslichen Teil des Gemenges der Chloride behandelte ich mit kochendem 95 %igem Alkohol und versetzte die so erhaltene Lösung mit einer alkoholischen Quecksilberchloridlösung, wobei ein weißes Quecksilberdoppelsalz in reichlicher Menge entstand. Das Doppelsalz wurde unter Zusatz von etwas Quecksilberchlorid aus Wasser umkrystallisiert, dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt.

Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierten Lösungen wurden eingedampft und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, wobei sich tafelförmige Krystalle ausschieden. Die Ausbeute betrug 0,75 g; im Capillarrohre erhitzt, schmolz das Chlorid unter Schäumen bei 232 bis 234° C (unkorr.).

Das Platindoppelsalz: Ein Teil des Chlorides wurde durch Zugabe von einer Platinchloridlösung in das Platinat übergeführt, das aus orangefarbigen Tafeln entstand und im Wasser leicht, im Alkohol schwer löslich war. Im Capillarrohre erhitzt, schmolz es unter Zersetzen bei 251° C (unkorr.).

0,2368 g Substanz ergaben . . . . 0,07240 g Pt

	Gefunden:	Berechnet für Betainplatinchlorid $[(C_5H_{11}NO_2.HCl)_2.PtCl_4]$:
Platin	30,57 %	30,25 %

Das Golddoppelsalz: Einen Teil des Chlorides führte ich in üblicher Weise in das Aurat über, das beim Umkrystallisieren und langsamen Verdunsten einer wässerigen Lösung orangegelbe Nadeln oder Blättchen lieferte, die in kaltem Wasser schwer löslich waren und, im Capillarrohre erhitzt, bei 235° C (unkorr.) schmolzen.

0,4430 g Substanz ergaben . . . . 0,19020 g Au

	Gefunden:	Berechnet für Betaingoldchlorid $(C_5H_{11}NO_2.HCl.AuCl_3)$:
Gold	42,93 %	43,10 %

Das Pikrat: Zur Darstellung von Pikrat wurde ein anderer Teil des Chlorides in wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Natriumpikratlösung versetzt, wobei sich gelbe Prismen ausschieden, die in Alkohol kaum, in Wasser leicht löslich waren. Im Capillarrohre erhitzt, schmolz es bei 180 bis 182° C (unkorr.).

Isolierung von Asparagin und Vernin.

1 kg lufttrockene Malzkeime wurde mit heißem Wasser extrahiert, das Extrakt mit Bleiessig versetzt und das durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreite Filtrat mit Mercurinitrat ausgefällt. Dieser Niederschlag wurde nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber getrennte Flüssigkeit wurde im Vakuum eingedunstet, mit Ammoniak neutralisiert und im Vakuumexsiccator stehen gelassen, um Asparagin und Vernin zu erhalten; aber es gelang nicht, diese Körper zu erhalten, trotzdem ich den Versuch wiederholte.

Zusammenfassung der Resultate.

Aus 1 kg lufttrockenen Malzkeimen wurden isoliert:

Histidin . . .	vorhanden
Cholin . . .	ca. 0,2 g
Betain . . .	ca. 0,6 g
Arginin . . .	nicht vorhanden
Vernin . . .	„ „
Asparagin . .	„ „

II. Die Zuckerarten in Malzkeimen.

(Befindet sich Saccharose in Malzkeimen?)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß bei Keimung von Gerstensamen, unter dem Einfluß der Amylase die Stärke zunächst in Maltose umgewandelt wird, die von dem Aufsaugeepithel aufgenommen und weiter in den Zellen des Keimlings in Saccharose umgewandelt wird; nicht die Maltose, sondern die Saccharose dient dem Keimling als Nährstoff. Nach Grüß wird die Maltose aus dem Endosperm von der Aleuronschicht aufgenommen, hier in Saccharose umgesetzt und dem Embryo zugeleitet. Demnach kann man vermuten, daß in Malzkeimen Saccharose vorhanden ist.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurden 200 g lufttrockene Malzkeime mit kochendem 95°/$_0$igem Alkohol am Rückflußkühler extrahiert, die Extrakte nach Vertreiben des Alkohols im Wasser aufgenommen und mit Bleiessig gereinigt. Das vom Blei befreite Filtrat wurde dann zum Sirup eingedampft, der zu folgenden Versuchen diente:

1. Nach Allihns Methode wurde in 100 Teilen Trockensubstanz der Malzkeime gefunden:

Reduzierender Zucker vor der Inversion (als Invertzucker)	3,366
„ „ nach „ „ „ „	4,643

2. Um die Frage, ob Saccharose in den Malzkeimen vorhanden ist oder nicht, genau zu entscheiden, benützte ich das polarimetrische Verfahren von Jolles[1]). Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip, daß mit Ausnahme der Saccharose alle anderen Zuckerarten durch das Erhitzen mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge optisch inaktiv werden.

Ungefähr 3 g des Sirups wurden mit 50 ccm $^{n}/_{10}$-Natronlauge im kochenden Wasserbade am Rückflußkühler $^{3}/_{4}$ Stunden lang erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Bleiacetat gefällt, das Filtrat mit Natriumphosphat entbleit, mit Tierkohle entfärbt und dann polarisiert Aber diese Lösung war optisch inaktiv.

3. Ein Teil des Sirups diente zur direkten Bestimmung des Drehungsvermögens. Es ergab sich, daß eine 16,5 %ige Lösung desselben 1,4° nach links (Lippischer Apparat) drehte.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß Saccharose nicht vorhanden war, sondern lediglich Maltose und Invertzucker.

Es ist möglich, daß die Saccharose, die aus der Maltose entstanden war, durch sekundäre Vorgänge wieder invertiert wurde.

Ferner beschäftigte ich mich mit der Isolierung von Inosit, aber alle meine Versuche ließen keine Spur davon erkennen.

---

[1]) A. Jolles, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 20, 631, 1910.

Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern.

Von

B. Slowtzoff.

(Aus der medizinischen Klinik Willie in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Frage nach den chemischen Veränderungen der Leber bei akuter Phosphorvergiftung ist gar nicht neu. Wir wissen schon seit langer Zeit, daß die Einführung von Antimon, Arsen und Phosphor sehr starke fettige Degeneration der Leber und anderer Organe hervorruft. Bei der mikroskopischen Untersuchung solcher Lebern kann man deutlich nachweisen, daß das Protoplasma der Leberzellen von den Fetttröpfchen verschiedener Größe infiltriert ist; diese Infiltration kann allmählich auch die Kernsubstanz angreifen, aber in den meisten Fällen bleiben die Kerne bis zu dem Tode des Tieres wenig verändert und bewahren ihre Farbe.

Seit Virchow nimmt man an, daß die Fettinfiltration der Leber von zwei ganz verschiedenen Prozessen bedingt sein kann. Bei guter Ernährung und nach der Aufsaugung großer Mengen des Fettes aus dem Darmkanal kann man eine Anhäufung des Fettes in der Leber bemerken. Die Menge der Eiweißkörper bleibt aber dabei normal. Bei der fettigen Degeneration korrespondiert die Anreicherung der Leber an Fett einem Zerfall des Protoplasmas und einer Verminderung der Eiweißkörper, so daß es möglich war anzunehmen, daß das Fett gerade aus dem Eiweißkörper entsteht. Eine Reihe von Autoren glaubt aber bewiesen zu haben, daß bei der akuten Leberatrophie das Fett nicht in den Leberzellen entsteht, sondern aus anderen Teilen des Körpers in die Leber transportiert ist. In exquisiten Fällen ist dieser Unterschied zwischen der fettigen Infiltration und fettigen Degeneration sehr deutlich, wie die von Perls (1) angeführten Analysen zeigen.

Die Zusammensetzung der menschlichen Leber (nach Perls).

	Normal	Infiltriert	Degeneriert
Wasser	77,0	61,9	81,6
Trockensubstanz	23,0	38,1	18,4
Fett	2,7	21,7	9,7
Eiweißkörper	21,3	16,4	8,7

Eine Reihe von Analysen, die von Hoeslin (2) gemacht wurden, hat gezeigt, daß eine fettige Degeneration auch bei verschiedenen langdauernden Infektionskrankheiten stattfinden kann. Diese Erscheinung kann durch Toxine oder durch Erhitzung des Körpers hervorgerufen sein.

Man kann auch hier noch die Resultate von Knasters Arbeit (nach Lukjanoff (3) anführen. Dieser Autor hat eine Reihe von Kaninchen mit Phosphoröl vergiftet und die Lebern der gestorbenen Tiere chemisch untersucht. Er gibt folgende Zahlen.

Die Zusammensetzung der Kaninchenleber.

	Normal	Vergiftet
Wasser	71,81	76,63
Trockensubstanz	28,19	23,37
Fett	5,07	6,82
Eiweißkörper	23,12	16,55

Botazzi (3) gibt eine Tabelle von Krüger wieder, aus der ersichtlich ist, daß bei akuter gelber Leberatrophie der Gehalt der Leber an Phosphor, Schwefel und Eisen herabgesetzt ist.

Ausführliche Analysen von Phosphorlebern sind von Waldvogel (4) gemacht. Er hat eine Reihe von Hunden mit verschiedenen Dosen von Phosphor vergiftet, und wenn der erste Hund, der die höchste Gabe bekam, starb, so tötete er alle Tiere, um aus Vergleichen der Zusammensetzung der Leber eine Vorstellung über das Einwirken des Phosphors zu bekommen. Aus seinen Schlüssen sei hier folgendes angeführt. Bei der Phosphorvergiftung steigt die Menge des Alkoholextraktes, der Fettsäuren und des neutralen Fettes, die Lecithine scheinen aber zu zerfallen. Der Verfasser glaubt auch bewiesen zu haben, daß in der Leber eine kleine Menge von Protagon zu finden ist. Die Methodik der Protagonbestimmung war aber sehr dürftig, und Meinertz konnte die Angaben von Waldvogel nicht bestätigen.

Bei der Phosphorvergiftung spielen sich in der Leber eine Menge von proteolytischen Prozessen ab, was Jacoby (7) auch experimentell bewiesen hat. Aus den Bestimmungen des Ammoniaks und der Eiweißkörper in der aseptisch aufbewahrten Leber konnte er feststellen, daß in der Phosphorleber die Autolyse viel schneller verläuft.

Aus der Arbeit von Wakeman (8) über den Gehalt der Hexonbasen in der mit Phosphor vergifteten Leber sieht man, daß mit dem Abbau der Eiweißkörper auch die Menge der Diaminosäuren vermindert

wird. Wenn wir noch die Arbeit von Almagia und Ducceschi (9) über den Gehalt der normalen und degenerierten Leber an lipolytischen und oxydierenden Fermenten (kein Unterschied gefunden) anführen, so wäre damit die Literatur über die chemische Veränderung der Phosphorleber, wenn wir die Angaben über den Fettgehalt unberücksichtigt lassen, erschöpft.

Aus dieser kurzen Zusammenstellung der Literaturangaben sieht man, daß unsere Kenntnisse in dieser Frage noch sehr dürftig sind, und ich hielt es für lohnend, in dieser Hinsicht einige neue Versuche zu machen.

Es wurden dazu 11 Hunde genommen, die gleichmäßig (mit Pferdefleisch und Roggenbrot) ernährt wurden. 5 davon dienten als Kontrolltiere, die übrigen wurden mit Phosphoröl vergiftet (0,5 ccm pro 1 kg) bis zu dem Tode, der ungefähr nach 6 bis 10 Tagen eintrat. Die Leber wurde mit Ringer-Lockscher Lösung durch die Pfortader sorgfältig vom Blut befreit, dann zwischen Fließpapier vom Wasser befreit, gewogen, in der Hackmaschine in Brei verwandelt und chemisch untersucht. Ein Teil des Breies wurde in ganz dünner Schicht auf Glasplatten gestrichen und bei 37° C getrocknet. Die getrocknete Masse wurde gepulvert, aufbewahrt und auf Fermentgehalt untersucht. Die vorläufigen Versuche haben uns gezeigt, daß bei solcher Bearbeitung der Fermentgehalt fast gar nicht verändert wird.

Wir wollen zuerst die Zahlen über das Gewicht der Leber bei normalen und vergifteten Hunden zusammenstellen.

	Kontrolltiere						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
Gewicht des Hundes in kg	9,2	8,7	7,4	8,5	10,0		
Gewicht der Leber in g	400	310	250	290	430		
Verhalten der Leber .	0,43	0,36	0,33	0,34	0,43		0,36
	Vergiftete Tiere						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
Gewicht des Hundes in kg	7,2	7,4	7,6	11,2	8,0	7,6	
Gewicht der Leber in g	220	240	244	250	225	197	
Verhalten der Leber .	0,31	0,32	0,32	0,22	0,28	0,27	0,25

Man sieht, daß bei der Phosphorvergiftung der Leber merklich eine Atrophie eintritt, so daß das Gesamtgewicht der Leber nur 0,25% des Körpergewichtes ausmacht.

Die Analyse des getrockneten Leberpulvers auf Trockensubstanz, Asche, Fett (Ätherextrakt) und Rest (Eiweißkörper) hat uns folgende Zahlen geliefert. Wir haben einigemal den Glykogengehalt der Leber bestimmt, aber er war sehr klein und in einigen Fällen gleich Null, so

daß wir wirklich den Rest der organischen Substanz (nach Abzug der Fettmenge) als Eiweißkörper annehmen können.

Zusammensetzung der Leber.

	Kontrolltiere						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
Trockensubstanz . .	25,53	24,92	24,92	24,10	25,10		24,91
Asche	0,82	1,22	0,66	0,70	0,85		0,85
Organische Substanz .	24,71	23,70	24,26	23,40	24,25		24,06
Fette	4,63	4,82	4,28	5,59	6,80		5,36
Eiweißkörper	20,08	19,88	19,88	17,81	17,55		18,70
	Vergiftete Tiere						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
Trockensubstanz . .	20,52	17,32	28,35	31,00	28,32	23,08	24,76
Asche	0,72	0,71	1,67	1,80	0,93	0,67	1,08
Organische Substanz .	19,80	16,61	26,68	29,20	27,39	22,41	23,69
Fette	9,68	9,04	6,08	14,49	16,20	9,42	10,82
Eiweißkörper	10,12	7,57	20,60	14,71	11,19	12,99	12,86

Der Wasser- und Aschegehalt der Leber während der Phosphorvergiftung ist normal, die Menge des Restes (resp. Eiweißkörper) wurde bedeutend niedriger (von 18,7 bis auf 12,86 %). Der Fettgehalt war fast verdoppelt (10,82 anstatt 5,36 %). In einigen Fällen, wie zum Beispiel Nr. 9 und 10, betrug der Fettgehalt 14,49 und sogar 16,20 %, also mehr als ein Drittel der Trockensubstanz.

Diese relative Vermehrung des Fettes und die Verminderung der Eiweißkörper tritt noch deutlicher hervor, wenn wir die absoluten Werte des Fettes und der Eiweißkörper in der Leber von Hunden derselben Größe zusammenstellen.

Gewicht des Fettes und der Eiweißkörper in der Leber.

Nr.	Gewicht des Tieres	Normaltiere		Nr.	Gewicht des Tieres	Vergiftete Tiere	
		Fett	Eiweiß			Fett	Eiweiß
3	7,4	12,45	49,70	6	7,2	21,30	22,26
				7	7,4	21,70	18,17
				8	7,6	16,59	30,66
				10	7,6	18,55	15,61
2	8,7	14,94	60,63	11	8,0	36,45	25,20
4	8,5	17,21	51,65				
1	9,2	18,52	80,92				
5	10,0	29,24	75,42	9	11,2	36,22	36,80

Um die Veränderungen der Eiweißkörper näher zu studieren, haben wir den gesamten Stickstoff in einige Fraktionen geteilt. Im ganzen konnte man leicht folgende 5 Fraktionen erhalten: 1. N der wasserlöslichen

Eiweißkörper (Albumine und Globuline), 2. N des in Wasser löslichen Nucleoproteids, 3. N des in 1°/₀₀iger Essigsäure löslichen Eiweißes, 4. N des in 1°/₀₀igem NaHO löslichen Nucleoproteids und 5. N des Restes (Stroma), der mikroskopisch aus Kernen und aus einer kleinen Menge Bindegewebe besteht. Da die Resultate ziemlich identisch waren, so begnügten wir uns mit 3 normalen und 3 Werten von vergifteten Tieren. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammenegstellt.

Fraktion	Normaltiere				Vergiftete Tiere			
	Nr. 1	2	3	Mittel	Nr. 6	7	8	Mittel
1	4,40	3,15	4,10	3,90	1,70	2,10	2,05	1,95
2	5,68	10,36	7,80	7,95	2,80	3,12	4,10	2,50
3	2,84	2,70	2,80	2,78	2,85	3,15	3,00	3,00
4	56,88	55,85	56,10	56,28	58,10	59,20	61,10	59,47
5	30,20	27,94	29,10	29,09	34,55	32,43	29,75	33,05

Im allgemeinen bleibt die Stickstoffverteilung fast normal. Nur die Menge des wasserlöslichen Nucleoproteids sinkt bedeutend: von 7,95 bis 2,50 %. Worauf das beruht, ist nicht ersichtlich; die Tatsache ist aber auch später mehrmals mit anderen Methoden bestätigt worden.

Um eine Vorstellung über den Zerfall von phosphorhaltigen Eiweiß-körpern zu bekommen, haben wir in dem mit Äther extrahierten Leberpulver, wo die Lecithine und Phosphatide ausgezogen waren, die Verteilung des Stickstoffes studiert und nach Kossels Methode die Menge der Xanthinkörper bestimmt.

Die Resultate dieser Analyse sind in der Tabelle zusammengestellt, und man kann deutlich bemerken, daß die degenerierten Lebern reicher an P_2O_5 und Xanthinkörpern sind. Bei dem Zerfall der Zellen ist also die Nucleingruppe viel beständiger und bleibt bis zu dem Tode des Tieres wenig angegriffen, N und P_2O_5 sind in Prozenten des getrockneten und entfetteten Pulvers wiedergegeben.

Die Verteilung des N und P_2O_5 in der Leber.

	Kontrolltiere				Vergiftete Tiere				
	Nr. 1	2	3	Mittel	Nr. 7	9	10	11	Mittel
Gesamt-N	11,26	8,42	8,20	9,19	8,81	14,45	13,61	14.10	12,74
N des Wasserextraktes	2,22	1,08	1,07	1,86	2,81	2,02	2,17	3,37	2,59
N der Eiweißkörper .	9,04	7,34	6,93	7,33	6,00	12,25	11,44	10,73	10,15
N der Xanthinkörper	0,731	0,757	0,684	0,724	1,270	2,000	1,650	1,660	1,640
Gesamt-P_2O_5	4,31	2,52	3,14	3,32	3,98	4,59	5,90	4,90	4,84
P_2O_5 des Wasserextraktes	1,37	1,29	1,88	1,51	1,53	1,08	1,46	1,49	1,39
P_2O_5 der Eiweißkörper	2,94	1,23	1,26	1,80	2,45	3,47	4,44	3,41	3,45

Es bleiben noch die Resultate des Fermentgehaltes in Leberpulvern zu erwähnen. Wir haben darin die Menge der Peroxydase (nach der Menge des aus Wasserstoffsuperoxyd gebildeten O), der Protease (nach Fermi) und Amylase (nach Wohlgemuth) bestimmt. Gewöhnlich wurde 0,1 g des Pulvers genommen, die Resultate sind aber um das zehnfache vermehrt, also auf 1 g der Leberpulver berechnet.

1 g der getrockneten Leber kann:

	Normalleber						
	Nr. 1	2	3	4	5		Mittel
O-Abspaltung in ccm .	454	438	474	480	520		473
Gelatine gelöst in g .	1,00	2,50	1,66	1,00	1,00		1,65
Stärke in Achroodextrin übergeführt in g . .	0,50	0,37	0,39	0,35	0,35		0,39
	Vergiftete Leber						
	Nr. 6	7	8	9	10	11	Mittel
O-Abspaltung in ccm .	322	350	360	240	304	320	316
Gelatine gelöst in g .	1,00	1,70	1,00	1,00	1,80	1,00	1,08
Stärke in Achroodextrin übergeführt in g . .	0,60	1,00	0,66	0,66	0,66	1,00	0,76

Bei der Phosphorvergiftung scheint also die Menge der Peroxydase und der Protease zu sinken, die der Amylase aber zu steigen. Die Tatsachen, daß die Menge des proteolytischen Fermentes sinkt und die autolytischen Prozesse in der Phosphorleber stärker verlaufen, sind schwer miteinander zu vereinbaren. Es bestehen hier zwei Möglichkeiten. Proteolytische (gelatinelösende) und autolytische Fermente können verschieden sein, oder die Reaktion des Leberbreies ist nach der Phosphorvergiftung saurer, und dadurch kann der autolytische Prozeß sich schneller entwickeln, obgleich die absolute Menge des Fermentes doch kleiner ist. Uns scheint diese zweite Erklärung der Wahrheit näher zu stehen, da die Reaktion der Phosphorleber merklich saurer ist als die der normalen Leber.

Wenn wir kurz alles tatsächliche Material zusammenstellen, so können wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der akuten Phosphorvergiftung wird das Gewicht der Leber kleiner.

2. Bei dieser Leberatrophie steigt die Menge des Fettes; die Eiweißkörper zerfallen.

3. Dieser Zerfall hängt hauptsächlich von dem Abbau von nicht phosphorhaltigen Eiweißkörpern ab.

4. Aus den Nucleoproteiden wird am stärksten das wasserlösliche Nucleoproteid angegriffen.

5. Die Phosphorleber enthält weniger Peroxydase und Protease und mehr Amylase.

Literatur.

1. Perls, Lehrbuch der allgem. Pathol., 1886.
2. Hoeslin, Arch. f. klin. Med. 33, 600, 1883.
3. Lukjanoff, Grundriß der allgemein. Pathol. (Russ.).
4. Botazzi, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1903.
5. Waldvogel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 200, 1904.
6. Meinertz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 371, 1905.
7. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 174, 1900.
8. Wakeman, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 335, 1908.
9. Almagia und Ducceschi, Arch. di Pharmacol speriment, 2, 1, 1903 (nach Maly).

Über die chemischen Veränderungen in der Leber bei einigen pathologischen Prozessen.

Von

B. J. Slowtzoff und L. W. Ssobolew.

(Aus der medizinischen Klinik Willie in St. Petersburg.)

(Eingegangen am 24. Januar 1911.)

Die Zusammensetzung der Leber ist nur in ganz groben Zügen bekannt. Viel besser sind ihre Funktionen, die sehr mannigfaltig in chemischem Sinne sind, erforscht. Das allgemeine Ziel aller dieser chemischen Prozesse ist, soweit wir wissen, die Bearbeitung verschiedener Substanzen, die aus dem Darme in den Leberkreislauf gelangen. Die Leberzellen, die auf dem Wege zwischen den Darmkanal und dem allgemeinen Kreislauf stehen, werden viel mehr als andere Zellen des Körpers von diesen Giften angegriffen und altern sehr früh. Unter der Wirkung der starken Gifte, wie Phosphor oder Arsen, gehen die Leberzellen sehr schnell zugrunde, und das ganze Tier stirbt bald unter Erscheinungen von sogenannter gelber akuter Leberatrophie; bei den chronischen Vergiftungen sterben die Leberzellen nur allmählich und werden durch Wucherung anderer Zellarten, am meisten von Bindegewebselementen, ersetzt.

Es schien interessant, an Leichenmaterial die Beziehungen zwischen den pathologischen, mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der Leber und den chemischen Veränderungen festzustellen. Obgleich diese Beziehungen vom theoretischen Standpunkte aus ganz verständlich sind, scheint, soweit es uns bekannt ist, das tatsächliche Material dazu nur sehr dürftig zu sein. Wir haben uns entschlossen, eine gesamte Bearbeitung des Leichenmaterials vom mikroskopischen und chemischen

Standpunkte aus zu machen. Das Schema der Untersuchung war folgendes:

Die Leber stammte von Leichen, die nach gewöhnlichen Regeln im pathologischen Institut seziert waren. Es wurden auch ca. 20 bis 50 ccm des Blutes aus dem Herzen als Probe genommen. Die Leber wurde mit einem scharfen Messer in möglichst feine Lamellen zerteilt und mit Fließpapier vom Überschuß des Blutes abgepreßt, dann mit der Fleischhackmaschine möglichst zerkleinert. Ein Teil dieses ziemlich homogenen Breies wurde auf Trockensubstanz, Stickstoff, Arten der Eiweißkörper untersucht, das andere auf Glasplatten in möglichst dünnen Schichten aufgestrichen und bei 37° C im Thermostat getrocknet. Nach 18 Stunden konnte man die Masse leicht von dem Glas abkratzen und pulvern. Dieses Pulver wurde in Glasgefäßen aufbewahrt und für die Bestimmung der Fermente benutzt.

In solchen Präparaten konnte man alle fermentativen Funktionen der Leber feststellen, wie es Wiechowski für Uricase und wir für Protease, Amylase und Peroxydase feststellen konnten.

Aus unseren Versuchen können wir als Beispiel den Versuch Nr. 40 hier anführen.

Nr. 40, Leber Nr. 56. 20 g frische Leber wurden während 24 Stunden mit 100 ccm Wasser digeriert. Trockensubstanz ergab sich zu 24,5%. Wir nahmen 4,9 g getrocknete Leber und digerierten sie mit 115 ccm Wasser. Die beiden Infuse wurden abfiltriert und erwiesen sich gleich stark. 2 ccm dieses Extraktes führten während 24 Stunden 10 ccm des 0,5%igen Stärkekleisters in Achroodextrin über und lösten 10 ccm 5%iger Gelatine.

Nun kam aber die Frage, inwieweit das Blut, das in dem Pulver geblieben war, auf den Fermentgehalt des Organs wirkt. Wir haben deswegen einige Versuche mit dem Fermentgehalt des Blutes und mit dem Gehalt des Blutes in den Organen ausgeführt. Als Beispiel dieser Reihe von Versuchen sei folgendes Protokoll hier angeführt:

2,5 g des Leberbreies wurden mehrmals mit Wasser extrahiert. Alle Extrakte wurden abfiltriert, zusammengemischt und auf 1 Liter aufgefüllt. Die Farbe dieses Extraktes wurde mit dem verdünnten Blute derselben Person im Großschen Colorimeter verglichen. Man konnte feststellen, daß 100 ccm dieses Extraktes 0,011 ccm des Blutes entsprechen, so daß wir in den 2,5 g der Leber nur 0,11 g Blut haben. Nun wurden 10 ccm 5%iger Gelatine und 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure in eine Reihe von Reagensgläsern getan und dazu der Leberextrakt und die dem Leberextrakt entsprechende wässerige Lösung des Blutes gefügt (0,11 ccm des Blutes auf 1000 ccm).

Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Auf 10 ccm 5%iger Gelatinelösung wirkten während 48 Stunden

Kubikzentimeter des Extraktes	Leberextrakt	das der Leber entsprechende Blut
0,5	–	–
0,75	–	–
1,00	–	–
1,25	–	–
1,50	+	–
1,75	+	–
2,00	+	–
2,25	+	–
2,50	+	+

Bei unseren Versuchen sieht man deutlich, daß die gelatinelösende Wirkung des Blutes viel schwächer ist als die der Leber, und wir glauben, daß die Veränderungen in der gelatinelösenden Kraft der Leberextrakte viel mehr auf die Leber als auf das Blut zu beziehen sind. Diese Tatsache entspricht den Resultaten des Versuches von Borchert, der zeigen konnte, daß die amylolytische Kraft der Leber auch stärker als die des Blutes ist.

Die Bestimmung der Fermente in der getrockneten und pulverisierten Leber bezog sich hauptsächlich auf die Menge der Peroxydase, der Amylase und der Protease. Die proteolytische Wirkung wurde nach Fermi aus der Menge der gelösten Gelatine ermittelt, die Menge der Amylase aus der Menge des Leberextraktes, der eine bestimmte Menge der Stärke in Achroodextrin überführen konnte (nach Wohlgemuth). Die katalytische Wirkung der Leber wurde aus der Menge des gebildeten Sauerstoffes (aus bestimmten Mengen des Wasserstoffsuperoxyds) berechnet.

Was die Bestimmung der Trockensubstanz und der fettartigen ätherlöslichen Substanzen und der Asche betrifft, so wurden sie nach den gewöhnlichen analytischen Methoden bestimmt. Wir hielten es auch für erwünscht, die verschiedenen Eiweißstoffe der Leber zu isolieren, und haben dafür folgende Methodik ausgearbeitet:

Es wurden ungefähr 4 bis 5 g des Leberbreies abgewogen und mehrmals mit destilliertem Wasser extrahiert; alle Extrakte wurden abfiltriert und zusammengemischt; nach 3 bis 4 Extraktionen mit ca. 200 bis 250 ccm konnte man alle in Wasser löslichen Eiweißkörper extrahieren. Der Extrakt wurde bis auf 1000 ccm verdünnt und dann der N nach

Kjeldahl bestimmt. Ein Teil des Extraktes wurde sehr schwach mit Essigsäure angesäuert und 24 Stunden stehen gelassen, bis alle Nucleoproteide ausfallen. Im Filtrate wurde wieder der N bestimmt; ein Teil des Filtrates wurde gekocht, von allen Eiweißkörpern (Albumine und Globuline) befreit und das Filtrat wieder auf den Stickstoffgehalt untersucht. Der mit Wasser extrahierte Rückstand der Leber wurde mit 1 °/₀₀ iger Essigsäure extrahiert. In den meisten Fällen konnte man damit eine geringe Anzahl Eiweißkörper extrahieren, deren Menge wieder durch Stickstoffbestimmungen (nach Kjeldahl) ausgedrückt werden kann. Der Rückstand wurde wieder mit 1 °/₀₀ igem NaHO mehrmals extrahiert und in diesem Extrakt wieder der Stickstoff bestimmt.

Aus allen diesen N-Bestimmungen kann man den gesamten Stickstoff der Leber in einige Fraktionen teilen. 1. Gesamtstickstoff; 2. N der Extraktivstoffe; 3. N der Albumine und Globuline; 4. N des in Wasser löslichen Nucleoproteides; 5. N der in 1 °/₀₀ iger Säure gelösten Eiweißkörper; 6. N des in 1 °/₀₀ igem NaOH löslichen Nucleoproteids und 7. der Rest, den wir vorläufig Stroma nennen werden. Da diese Analysen ziemlich lange Zeit dauerten, so schien es uns interessant, die Grenzen der Fehler zu bestimmen. Als Beispiel seien die Resultate zweier parallel gemachter Bestimmungen angeführt.

	Bestimmung Nr. 1	Bestimmung Nr. 2
Gesamt-N	2,670	2,640
N der Extraktivstoffe	0,821	0,747
N der Albumine und Globuline	0,465	0,527
Wasserlösliche Nucleoproteide	0,184	0,176
In 1 °/₀₀ iger Essigsäure lösliche Eiweißkörper	0,082	0,085
In 1 °/₀₀ igem NaOH lösliche Nucleoproteide	1,002	0,995
Stroma (berechnet)	0,106	0,100

Wir können hier einige Resultate unserer Versuche an Lebercirrhosen und luetischen Lebern anführen, da das übrige Material noch nicht zahlreich genug ist. Als Vergleich dienten uns die Lebern von Personen, die an verschiedenen Krankheiten gelitten haben, deren Lebern jedoch nach pathologisch-anatomischen Untersuchungen als normal befunden waren.

Wir haben 5 Lebern als Kontrolle genommen: Nr. 94 (Strictura Oesophagi), Nr. 9 (Phthisis pulmonum), Nr. 131 (Cancer mammae), Nr. 104 (Pleuritis purulenta); Nr. 1 (Pyaemia). Die zu diesen Fällen gehörenden Zahlen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
Gewicht des Körpers (kg)	45,9	58,8	39,3	73,8	40,0	
Gewicht der Leber . . .	0,98	1,7	1,4	1,65	1,1	1,38
Verhalten des Gewichtes der Leber zu dem Gewichte des Körpers . .	2,13	2,9	3,6	2,3	2,8	2,74
Blutgehalt in der Leber in %	5,0	4,8	3,5	2,0	2,8	3,6

Das mittlere Gewicht der Leber betrug also 1380 g, was ziemlich normal ist. Das Gewicht der Leber war im Mittel 2,74% des Körpergewichtes. Der Gehalt der getrockneten Lebern an Fermenten ist in folgender Tabelle zusammengestellt und so ausgedrückt (durch Berechnen), daß man daraus die Stärke der peroxydativen, amylolytischen und autolytischen Kraft der Leber pro 1 g Substanz ersieht.

	Extrakt aus 1 g Leber					
	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
bildet O in ccm	312	316	342	342	240	316
verflüssigt Gelatine in g .	2,0	2,50	3,3	2,50	2,00	2,46
löst Stärke in g	0,2	0,25	0,2	0,35	0,20	0,22

Daraus ist ersichtlich, daß der Fermentgehalt aller Lebern dieser Reihe ziemlich gleichmäßig war.

Die Zusammensetzung dieser Lebern stellte sich in folgender Weise dar:

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
Trockensubstanz	27,67	28,54	28,10	27,59	24,56	27,29
Asche	0,63	1,00	0,84	0,85	1,18	0,90
Organische Substanz . .	27,04	27,54	27,26	21,74	23,38	26,34
Fette (ätherlöslich) . . .	9,53	5,30	12,60	6,30	5,62	7,34
Eiweißkörper	17,51	22,24	14,66	20,44	17,76	19,05

Die Verteilung des Stickstoffes in den Lebern ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Nr. 94	Nr. 9	Nr. 131	Nr. 104	Nr. 1	Mittel
N der Extraktivstoffe . .	15,8	8,0	11,8	13,0	9,2	11,4
N der Albumine und Globuline	13,5	19,6	10,0	6,0	10,0	11,8
N des wasserlöslichen Nucleoproteids . . .	4,9	2,8	6,9	6,9	9,8	6,2
N der in 1‰iger Säure löslichen Eiweißkörper	15,5	7,4	10,0	11,8	10,0	10,0
N der in 1‰igem NaHO löslichen Eiweißstoffe .	31,7	32,1	35,0	47,2	40,0	35,2
Stroma	34,7	38,0	38,1	31,0	31,0	35,9

Die Summe der zwei ersten Fraktionen entspricht ziemlich gut dem Blutgehalt der Leber.

	Gesamt-N der Extraktivstoffe und der Albumine und Globuline	Gehalt des Blutes in % der Leber
Nr. 94	29,3	5,0
Nr. 9	27,6	4,8
Nr. 131	21,8	3,5
Nr. 104	19,0	2,0
Nr. 1	19,2	2,8

Die zweite Gruppe unserer Lebern bezieht sich auf Cirrhosen verschiedener Art. Nr. 56, 52, 58, 96 und 120.

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 96	Nr. 120	Mittel
Gewicht des Körpers (kg)	64,8	46,0	62,3	61,8	89,6	
Gewicht der Leber	1,45	1,28	1,32	1,47	2,09	1,52
Verhalten der Leber zu dem Körpergewicht	2,24	2,52	2,12	2,38	2,33	2,3
Blutgehalt in %	4,2	5,4	5,6	2,0	5,6	4,6

Im Mittel war also das Gewicht der Leber 1522 g und betrug 2,3% des Gesamtgewichtes des Körpers.

Die Resultate des Fermentgehaltes sind folgende:

	1 g der Leber					
	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 96	Nr. 120	Mittel
bildet O in ccm	274	274	380	145	290	275
verflüssigt Gelatine in g	2,20	2,10	2,00	2,50	2,00	2,17
löst Stärke in g	0,27	0,27	0,25	0,25	0,30	0,27

Man sieht deutlich, daß die Menge der Peroxydase und des gelatinelösenden Fermentes im ganzen niedriger ist, die amylolytische Kraft scheint aber in den normalen Grenzen zu bleiben.

Wenn wir nun die Resultate der gewöhnlichen Zusammensetzung unserer Lebern, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind, betrachten, so sehen wir, daß die Menge der Trockensubstanz in dieser ganzen Reihe niedrig ist und nur in einem Falle, wo man bei der mikroskopischen Untersuchung eine Wucherung des Bindegewebes fand, etwas höher als in der Norm. Parallel dem erhöhten Wassergehalt der Leber sank der Fettgehalt von den mittleren 7,34% bis auf 4,43%; solche Beziehungen zwischen dem Wasser- und Fettgehalt der Organe

sind mehreremal in verschiedenen pathologischen Zuständen angedeutet. Die Menge der Eiweißkörper scheint normal zu bleiben; der Aschegehalt wird etwas größer, was in gewissem Sinne vielleicht auf den erhöhten Gehalt der Leber an Blut zu beziehen ist.

Die Zusammensetzung der cirrhotischen Lebern.

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 76	Nr. 120	Mittel
Trockensubstanz	25,64	21,73	27,12	21,06	23,80	24,70
Asche	1,39	0,90	1,67	0,84	1,62	1,48
Organische Substanz	24,25	20,73	25,45	20,22	22,18	23,22
Fette	5,99	3,61	3,16	3,63	6,05	4,49
Eiweißkörper	18,26	17,12	22,49	16,59	16,13	18,73

Die Verteilung der verschiedenen Stickstoffformen kann man sich folgendermaßen vorstellen:

	Nr. 56	Nr. 52	Nr. 58	Nr. 76	Nr. 120	Mittel
N der Extraktivstoffe	18,2	22,0	14,1	16,4	16,6	19,5
N der Albumine u. Globuline	29,15	22,90	24,44	7,82	17,60	18,27
N des wasserlöslichen Nucleoproteids	7,44	8,70	7,68	6,45	5,30	7,38
N der in 1‰iger Säure löslichen Eiweißkörper	7,50	8,21	7,25	7,32	4,47	6,95
N der in 1‰igem NaHO löslichen Eiweißkörper	38,63	55,02	46,83	63,59	50,27	52,67
Stroma	12,47	17,15	13,82	14,98	13,40	18,03

Bei den Stauungserscheinungen mit dem Wassergehalt der Organe steigt die Menge der Extraktivstoffe und der Albumine und Globuline bedeutend, was natürlich mit dem Blutgehalt der Leber in engster Beziehung steht. Sehr bedeutend verminderte sich die Fraktion der Stroma von 36,9% bis auf 15,03% des Stickstoffes.

Diese Verminderung des Stickstoffes der Stroma scheint uns in einer Beziehung zu der Verminderung der Kernsubstanz zu stehen.

Wenn wir nun die Haupterscheinungen bei den Stauungslebercirrhosen zusammenstellen, so kann man sich folgendes Bild vorstellen. Die Menge des Wassers steigt, und damit wird auch die Menge der Extraktivstoffe und der Asche niedriger; der Fettgehalt sinkt. Aus verschiedenen Eiweißkörpern der Leberprotoplasma wird die Kernsubstanz ver-

mindert, und ihr Fermentgehalt (hauptsächlich) an Peroxydase sinkt unter die normalen Grenzen.

Aus unserem Material seien noch einige Resultate über syphilitische Lebern zusammengestellt. 4 mal wurde das Material direkt den Leichen entnommen und 3 mal erhielten wir das Material schon in getrocknetem Zustande (als Antigene für Wassermanns Reaktion).

Die allgemeine Zusammensetzung ist in folgender Tabelle wiedergegeben:

	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	α	β	γ	δ	Mittel
Trockensubstanz	22,94	25,91	26,10	26,10	25,80	24,0	26,2	25,29
Asche	1,13	0,58	0,62	—	0,70	—	—	0,75
Organische Substanz	21,81	25,33	25,48	—	25,10	—	—	24,54
Fette	2,86	7,34	6,30	4,80	—	4,30	—	5,02
Eiweißkörper	18,95	16,99	19,18	—	—	—	—	19,52

Die Zusammensetzung der luetischen Lebern scheint im ganzen ziemlich normal zu sein. Nur der Wassergehalt ist etwas größer.

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung in der Lebersubstanz in drei Fällen, die in folgender Tabelle zusammengestellt sind, gibt auch fast normale Werte.

Die Verteilung des Stickstoffes in der Leber.

	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	Mittel
N der Extraktivstoffe	3,7	2,3	2,6	2,9
N der Albumine und Globuline	5,5	15,70	15,70	12,2
N des in Wasser löslichen Nucleoproteids	9,2	4,0	2,61	5,3
N des in 1‰iger Essigsäure löslichen Eiweißes	12,4	8,3	13,96	11,5
N des in 1%igem NaHO löslichen Eiweißes	44,1	34,3	37,8	38,7
Stroma	28,2	37,7	29,94	32,3

Es bleiben noch einige Zahlen über den Fermentgehalt der syphilitischen Lebern anzuführen.

	1 g der Leber						
	Nr. 8	Nr. 13	Nr. 23 I	α	β	γ	Mittel
bildet O in ccm	78	264	35,2	38,4	200,0	80,0	236
verflüssigt Gelatine in g	0	0	0,6	1,00	0,6	0	0,35
löst Stärke in g	0,33	0,33	0,25	0,28	0,30	0,32	0,31

Bezüglich des Fermentgehalts sind die luetischen Lebern sehr interessant. Die Menge der Peroxydase ist im Mittel normal, bietet aber sehr große individuelle Schwankungen. Die Menge der Protease war in drei Fällen gleich Null. Diese Erscheinung steht in einem gewissen Zusammenhang mit der Tatsache, die von Dr. Minz[1]) in unserer Klinik festgestellt wurde, daß in dem Blut von Luetikern die Menge des Antitrypsins unter die normale Grenze sinkt.

Wir haben deswegen vergleichende Bestimmungen der proteolytischen und amylolytischen Kraft des normalen und luetischen Blutserums gemacht. Im Mittel kann 1 ccm des Blutserums von normalen Menschen 0,2 g Stärke in Achroodextrin überführen und 0,5 g Gelatine lösen. Das Blutserum, bei dem die Wassermannsche Reaktion positiv ausfiel, konnte nur 0,1 g Stärke und 0,25 g verarbeiten.

Uns scheint, daß wir aus den angeführten Versuchen folgende Schlüsse ziehen können:

1. Es ist sehr wünschenswert, die gleichzeitige morphologische, pathologisch-anatomische und chemische Untersuchung bei Organen zu machen.

2. Die kleine Menge des in der Leber enthaltenen Blutes scheint ohne besondere Wirkung auf die Resultate der chemischen Untersuchung zu sein, was den Fermentgehalt betrifft, da das Zellenprotoplasma viel reicher an Fermenten als das Blut ist.

3. Bei der Stauungscirrhose geht parallel den mikroskopischen Veränderungen in der Balkenstruktur der Leberzellen und der Degeneration der Leberzellen eine Vermehrung des Wassergehaltes der Lebergewebe; die Menge des Fettes sinkt unter die Norm. Die Leber wird reicher an Extraktivstoffen und ärmer an Nucleinen und Peroxydase.

4. In der Leber der Luetiker bleibt die Zusammensetzung der Leber fast normal. Der Fermentgehalt scheint sich aber bedeutend zu vermindern.

---

[1]) Minz, Russki Wratsch 1910, Nr. 5.

Studien über die Wirkungen des Kobragiftes.

Von

Ivar Bang und E. Overton.

(Aus dem medizinisch-chemischen und dem pharmakologischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 25. Januar 1911.)

Einleitung.

Die vorliegende Untersuchung über die Wirkungen des Kobragiftes, die im Frühjahr 1910 ausgeführt wurde, kam folgendermaßen zustande:

Der eine von uns (Bang) hatte sich schon früher vielfach mit den hämolytischen Wirkungen des Kobragiftes beschäftigt, während der andere im Jahre 1909 gefunden hatte, daß Kaulquappen ein vorzügliches Versuchsobjekt bieten, um die verschiedenen Wirkungen des Kobragiftes, namentlich die Wirkungen auf das Zentralnervensystem, zu studieren, indem diese Vergiftungserscheinungen, selbst noch in sehr weit vorgeschrittenen Stadien der Vergiftung, in demselben Sinne reversibel sind wie die narkotischen Wirkungen von Äther oder Chloroform. Wie bei den letztgenannten Verbindungen entsprechen die Vergiftungssymptome ganz bestimmten Konzentrationen des Kobragiftes in den die Kaulquappen umspülenden Lösungen.

Kaulquappen können infolgedessen (wie bei zahlreichen Lösungen anderer Verbindungen) als quantitative Indicatoren für bestimmte Konzentrationen des Kobragiftes (resp. jenes Bestandteils desselben, der auf das Zentralnervensystem wirkt) in einer Lösung verwendet werden, wobei aber natürlich der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Vergiftungsprozeß zunächst studiert werden muß.

Wir haben dann gemeinsam einen Arbeitsplan für die vorliegende Untersuchung besprochen, einen Plan, der freilich infolge der relativ kurzen Zeit, während der Kaulquappen in den günstigsten Entwicklungsstadien zur Verfügung standen, nur teilweise durchgeführt werden konnte.

In der Ausführung der Versuche wurde die Arbeit so verteilt, daß Overton vorwiegend die in Kapitel I und III beschriebenen Versuche sowie die Versuche über den Einfluß der Neutralsalze und der Sera, die im dritten Kapitel behandelt werden, ausführte, während Bang die Mehrzahl der Versuche im Kapitel IV und die Versuche über den Einfluß der alkalisch reagierenden Verbindungen, die im Kapitel III beschrieben sind, übernahm.

Zu allen Versuchen in dieser Arbeit wurden Kaulquappen von Rana fusca (Rana temporaria der Autoren) verwendet. Der Laich wurde im Freien gesammelt, sobald die beginnende gleichmäßige Entwicklung der Eier durch das unbewaffnete Auge konstatiert werden konnte. Verfügt man nicht über Apparate, wie sie bei der künstlichen Fischzucht in Anwendung kommen, so züchtet man die Kaulquappen am besten in großen, flachen Glasschalen, wobei die Laichklumpen teilweise zu zerschneiden und flach auszubreiten sind. Das Wasser ist, sofern man die Züchtung nicht in immer fließendem Wasser vornehmen kann, häufig zu erneuern. Ganz zweckmäßig ist der tägliche Zusatz von etwas reinem Wasserstoffsuperoxyd, jedoch so, daß die Konzentration desselben nach der Mischung nicht mehr als 1:5000 beträgt.

Nachdem die Mehrzahl der Kaulquappen aus den Gallertklumpen ausgeschlüpft sind und sich an den Rändern der Schale angesammelt haben, werden sie mittels einer Glasröhre in eine neue Schale mit Leitungswasser übergeführt.

Speziell für Versuche mit Kobragift sind Kaulquappen von 14 bis 18 mm Länge die günstigsten. Kaulquappen von mehr als 20 mm Länge sind kaum brauchbar, da die Sterblichkeit unter ihnen im Laboratorium recht groß ist und sie eine viel geringere Gleichmäßigkeit aufweisen.

Alle toten Kaulquappen sind so bald als möglich zu entfernen, teils weil sie die Entwicklung von Bakterien in den Kulturen befördern, teils weil sie von ihren Geschwistern aufgefressen werden. Da, wenn letzteres eintritt, ein Teil der Kaulquappen Gelegenheit hat, Nahrung aufzunehmen, andere nicht, so wird die Gleichmäßigkeit der Kulturen gestört und die Versuchslösungen werden durch Exkremente stark verunreinigt.

Das Dottermaterial genügt vollständig für die Entwicklung, bis die Kaulquappen eine Länge von über 18 mm erreicht haben, obgleich; wenn sie dazu Gelegenheit haben, sie bald nach dem Ausschlüpfen zu fressen anfangen.

Eine Stunde oder mehr vor der Anwendung zu Versuchszwecken werden einige Kaulquappen in destilliertes Wasser übergeführt und dieses Wasser häufig erneuert, so daß es immer rein bleibt. Auch die Maßkulturen sind so rein und bakterienfrei wie möglich zu halten.

Aus dem destillierten Wasser werden die Kaulquappen in die Versuchslösungen übergeführt, die ebenfalls mit destilliertem Wasser bereitet

werden müssen. Alle Überführungen von Kaulquappen aus einem Gefäß in ein anderes haben mit Glasröhren zu geschehen, deren unterer Rand glattgeschmolzen ist. Die Kaulquappen werden so wenig wie möglich direkt berührt, um eine Verletzung der Hautepithelien zu vermeiden, die namentlich bei jungen Kaulquappen gegen mechanische Insulte sehr empfindlich sind.

Von größter Bedeutung ist, nur solches Wasser zu verwenden, das (bei der letzten Destillation) nur mit Glasgefäßen in Berührung gekommen ist. Man redestilliert am besten das gewöhnliche destillierte Wasser in Jenakolben, wobei das Destillat auch in Jenakolben aufgefangen wird und die Kühlung der Dämpfe durch einen Glaskühler erfolgt.

Das gewöhnliche destillierte Wasser ohne Redestillation in Glasgefäßen ist bei allen etwas länger dauernden Versuchen mit Kaulquappen, kleinen Fischen oder dünnen Muskeln (Frosch-Sartorii) zur Bereitung der Versuchslösungen oder zum Aufbewahren der Kaulquappen oder Fische vor dem Beginn der Versuche völlig unbrauchbar, da es meist schon nach kurzer Zeit (häufig schon innerhalb 1 bis 2 Stunden oder noch kürzerer Zeit) junge Kaulquappen infolge eines geringen Gehalts an Kupfer oder anderen Schwermetallen tötet. Dies muß immer wieder betont werden, da man noch heute in der wissenschaftlichen Literatur über Muskelversuche u. dgl. nicht selten am Schlusse der Arbeit die Angabe findet, daß die Lösungen mit gewöhnlichem destilliertem Wasser bereitet wurden, da ein Vorversuch gezeigt hatte, daß dies nicht schädlich wirkte. Dazu ist zu bemerken, daß der Umstand, daß gewöhnliches destilliertes Wasser gelegentlich nicht oder nur wenig schädlich wirkt, absolut keine Garantie bietet, daß Wasser, in denselben Apparaten destilliert, auch ein anderes Mal unschädlich sein wird. Es ist leicht einzusehen, daß dies auf einer Menge nicht näher kontrollierbarer Umstände beruhen wird, wie z. B. darauf, ob zufällig ein Teil des Wassers längere Zeit mit dem Kühler oder der Vorlage in Berührung gewesen ist oder nicht usw. Tatsache ist, daß Wasser, das in den gewöhnlichen metallenen Destillationsapparaten destilliert worden ist, in den meisten Fällen schädlich wirkt, was die Resultate von Versuchen, bei denen derartiges Wasser zur Bereitung der Lösungen verwendet worden ist, durchaus unzuverlässig macht. Dies gilt aber natürlich nur dann, wenn die Versuchsobjekte, wie bei allen unseren Versuchen, mit relativ großen Mengen der Lösungen in Wechselwirkung kommen, während bei Injektionen von wenigen Kubikzentimetern Lösung in ein Tier, das über 100 g wiegt, es im wesentlichen gleichgültig sein wird, ob man gewöhnliches oder in Glasapparaten destilliertes Wasser zur Bereitung der Lösungen verwendet.

Bei genaueren Versuchen kann man nicht Leitungswasser zur Bereitung der Lösungen benutzen, da, wie wir später sehen werden, schon äußerst geringe Mengen Kalksalze in der Lösung die Versuchsresultate beeinflussen.

In Wasser, das in Glasgefäßen destilliert worden ist, leben Kaulquappen wochenlang, ohne Störungen aufzuweisen.

Vor der Überführung der Kaulquappen in die Versuchslösungen müssen diese durch Schütteln mit Luft oder reinem Sauerstoff gesättigt werden. Die günstigsten Versuchstemperaturen sind 10 bis 18° C. Temperaturen über 20° sind viel weniger günstig, namentlich bei solchen Versuchen, wo eine vollständige Lähmung des Zentralnervensystems eintritt. Bei diesen höheren Temperaturen werden nämlich Kaulquappen, wenn ihre Respirationsbewegungen aufgehört haben, nicht mehr genügend mit Sauerstoff versehen. Es wäre ganz zweckmäßig, bei solchen höheren Temperaturen eine Sättigung der Lösungen mit Sauerstoff statt mit Luft vorzunehmen. Einer der Hauptvorteile der Kaulquappen als Versuchsobjekte liegt eben in dem Umstande, daß sie bei nicht zu hoher Temperatur und bei reichlichem Gehalte der Lösungen an gelöster Luft resp. an gelöstem Sauerstoff selbst bei aufgehobenen Respirationsbewegungen tagelang leben können, indem die Hautepithelien, die z. T. aus flimmernden Zellen aufgebaut sind, eine zur Unterhaltung des Lebens genügende Menge Sauerstoff aufzunehmen vermögen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung genügt es meist, die Kaulquappen in einer Petrischale mit wenig Lösung bei einer 100fachen Vergrößerung zu besichtigen. Will man stärkere Vergrößerungen anwenden, so untersucht man im hängenden Tropfen. Bei ganz jungen Kaulquappen von R. fusca kann man meist nur die Zirkulationsverhältnisse im Schwanze, den Lippen usw. leicht wahrnehmen, bei etwas älteren, wo das Pigment weniger gleichmäßig verteilt ist, kann man das Herz sehr gut direkt beobachten.

Zur Bereitung der übrigen Kobragiftlösungen wurde stets eine 1‰ige Stammlösung benutzt. Diese wurde alle 8 Tage frisch bereitet und im Eisschrank aufbewahrt. Innerhalb 8 Tagen nimmt die Wirksamkeit einer solchen Lösung um weniger als 10% ab.

Das zu den Versuchen verwendete Kobragift verdanken wir der großen Güte und Liberalität des Direktors des Seruminstituts in Kopenhagen, Herrn Dr. Madsen, und wir möchten ihm dafür auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Schließlich ist zu bemerken, daß wir über die wichtigsten Resultate dieser Untersuchung am 31. Mai 1910 einen Vortrag in Lunds Läkaresällskap hielten, bei welcher Gelegenheit einige der Hauptversuche demonstriert wurden (z. B. die normale Fortdauer der Zirkulation bei Kaulquappen, die in Kobragiftlösungen von 1:600000 und 1:800000 seit 24 Stunden verweilt hatten und deren Zentralnervensystem inklusive des Respirationszentrums völlig gelähmt war; die Aufhebung der Giftwirkungen relativ starker Kobragiftlösungen durch Anwesenheit von 0,2%igem $CaCl_2$ in den Lösungen; die Aufhebung der Vergiftung durch Antivenin; die starke Speicherung des „Neurotoxins“ durch rote Blutkörperchen usw.). Ein Autoreferat über diesen Vortrag erschien in der schwedischen Zeitschrift „Hygiea“.

Kapitel I.

Über das Verhalten von jungen Kaulquappen nach der Überführung in mit destilliertem Wasser bereiteten Kobragiftlösungen von ungleicher Konzentration.

Unter Kobragift ist in den folgenden Versuchen wie überall in dieser Abhandlung das gesamte getrocknete Sekret der Giftdrüsen zu verstehen, und ebenso z. B. unter einer 1°/₀₀igen Kobragiftlösung eine Lösung zu verstehen, die bereitet wird durch Auflösung von 1 Teil des getrockneten Sekrets in 999 Teilen Wasser. Da das Sekret der Giftdrüsen einen hohen Prozentsatz indifferenter Verbindungen (hauptsächlich Proteinsubstanzen) enthält, so wird die wirkliche Konzentration der wirksamen Verbindung oder der wirksamen Verbindungen eine noch viel geringere sein als die in den einzelnen Versuchen angegebene Gesamtkonzentration an dem getrockneten Sekret, was sehr zu beachten ist. Solange zuverlässige Angaben über den Gehalt des Sekrets an wirksamer Substanz fehlen, hat man keine andere Methode, die Stärke der verwendeten Lösungen anzugeben. Die verschiedenen Proben des von uns benutzten Kobragiftpräparats zeigten sich durchaus gleichmäßig stark wirksam.

Wenn man 12 bis 15 mm lange Kaulquappen von Rana fusca aus destilliertem Wasser in 0,2 bis 1°/₀₀ige Lösungen von Kobragift überführt, so sterben sie schon nach wenigen Minuten, und kurze Zeit darauf zerfallen die Hautepithelien. Versuche mit solchen stärkeren Lösungen sollen an anderer Stelle mitgeteilt werden, und deren nähere Beschreibung kann hier unterbleiben; dagegen wird es von Vorteil sein, einige Versuche etwas ausführlicher wiederzugeben, die mit Lösungen von 1 : 25000 bis 1 : 100000 Kobragift angestellt wurden, weil dieselben für die Beurteilung der Geschwindigkeit des Überganges der eigentlichen giftigen Bestandteile des Kobragiftes von größerer Bedeutung sind, obgleich selbst Lösungen von diesen geringen Gehalten ziemlich rasch tödlich auf die Kaulquappen wirken und auch die Hautepithelien allmählich direkt angreifen. Wie sich später ergeben wird, zeigen sich die resorptiven Wirkungen des Kobragiftes in ihrer vollen Reinheit erst bei noch bedeutend geringeren Konzentrationen als 1 : 100000.

Versuch mit 1:25000 Kobragift.

Um 6³⁴ p. m. des 4. VI. 1910 wurden zwei 17 bis 18 mm lange Kaulquappen von **Rana fusca** in 10 ccm einer Lösung von 1 : 25 000 Kobragift (in destilliertem Wasser) übergeführt. Temp. 20¹/₂° C.

Um 6⁴¹ p. m., also schon nach 7 Minuten, beide Kaulquappen fast bewegungslos.

Um 6⁴⁸ p. m. (14 Minuten nach Beginn des Versuchs) die eine Kaulquappe völlig unerregbar, die andere nur noch eben merklich erregbar.

Zwischen 7 und 7⁰⁵ p. m. mikroskopisch untersucht, zeigte sich die Zirkulation bei beiden Kaulquappen noch vorhanden, aber ziemlich langsam. Keine Respirationsbewegungen der Kiemen, aber die Zirkulation in den Gefäßen der Kiemenblätter noch gut erhalten, Herzbewegungen direkt sichtbar.

Um 7³⁰ p. m., also schon nach weniger als 1 Stunde vom Beginn des Versuchs, beide Kaulquappen tot; Hautepithelien im Zerfall begriffen.

Versuch mit Kaulquappen in 1:50000 Kobragift.

Um 6³⁵ p. m. d. 4. VI. 2 Kaulquappen in 20 ccm 1 : 50000 Kobragift, in dest. Wasser gelöst, übergeführt. Kaulquappen 18 mm lang, Temp. 20¹/₂° C.

Um 6⁴⁸ p. m. Bewegungen bereits beeinträchtigt.

Um 6⁵¹ p. m. beide Kaulquappen schon sehr stark gelähmt, aber doch noch etwas erregbar.

Um 6⁵⁵ p. m. beide völlig gelähmt und unerregbar.

Um 7³⁰ p. m. tot.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:100000, 1:200000 und 1:300000 Kobragift.

Um 7 p. m. des 23. IV. 1910 wurden je 3 Kaulquappen von ca. 15 mm Länge in a) 1:100000, b) 1:200000 und c) 1:300000 Kobragift, in dest. Wasser gelöst, übergeführt. Jedesmal wurden 40 ccm Lösung verwendet. Temp. 14° C.

Um 8¹⁵ p. m. des 23. IV. waren die Kaulquappen in Lösung a) alle schon gelähmt, die in Lösung b) ziemlich träge.

Um 9³⁰ p. m. des 23. IV. alle Kaulquappen in Lösung a) völlig unbeweglich, mit mehr oder weniger beschädigten Hautepithelien.

Um 9⁴⁵ p. m. des 23. IV. (also nach 2³/₄ Stunden) kann eine Kaulquappe in der Lösung b (1:200000) sich noch etwas bewegen, die Bewegungen sind aber sehr träge; die zwei anderen Kaulquappen in b) sind unbeweglich, aber mit gut erhaltener Zirkulation.

Um 9⁵⁰ p. m. des 23. IV. Kaulquappen in c) (1:300000) noch etwas beweglich, aber recht träge.

Am nächsten Morgen (24. IV.) alle Kaulquappen in a), b) und c) tot, die in a) und b) mit teilweise abgestoßenen Hautepithelien. In c) sind die Hautepithelien weniger beschädigt als in a) und b).

Besonders interessant ist der folgende Versuch, der daher ausführlich mitgeteilt werden soll.

Versuch mit Kaulquappen in einer Lösung von 1:400000 Kobragift in destilliertem Wasser.

Um 7[05] p. m. des 23. IV. wurden drei 15 mm lange Kaulquappen von Rana fusca in 40 ccm einer Kobragiftlösung von 1:400000 übergeführt. Temp. 14° C.

Um 9[55] p. m. des 23. IV. (also nach fast 3 Stunden) alle 3 Kaulquappen etwas beweglich, Bewegungen aber sehr träge, Kaulquappen sonst gut aussehend.

Am nächsten Morgen um 10[00] a. m. (also nach 15 Stunden, vorher nicht untersucht) alle 3 Kaulquappen völlig unerregbar, aber recht gut aussehend, Zirkulation vorzüglich, keine Atmungsbewegungen.

Um 7[02] p. m. d. 24. IV., also 24 Stunden nach Beginn des Versuchs, Zirkulation bei allen 3 Kaulquappen immer noch vorzüglich, aber Kaulquappen völlig unerregbar.

Darauf (7[05] p. m.) wurden 2 dieser Kaulquappen (a) in reines Wasser übergeführt. Die dritte Kaulquappe (b) wurde in der Lösung zurückgelassen.

Noch um 2[30] p. m. des 27. IV., also 67 1/2 Stunden nach Überführung in reines Wasser, waren die beiden Kaulquappen (a) völlig unbeweglich und ohne Atmungsbewegungen, aber mit sehr gut erhaltener Zirkulation.

Um 11[58] p. m. des 27. IV. diese 2 Kaulquappen etwas erregbar; sie bewegen sich schwach, wenn angerührt.

Am Morgen des 28. IV. beide Kaulquappen bedeutend besser beweglich als bei der letzten Beobachtung, aber selbst noch um 7[30] p. m. d. 28. IV. etwas träger als normal, jedoch im übrigen gesund.

Am Morgen des 29. IV. beide völlig normal, spontan beweglich.

Die in der Lösung zurückgelassene Kaulquappe (b) war um 7[30] p. m. d. 28. IV. immer noch völlig unerregbar und ohne Atmungsbewegungen, aber mit sehr gut erhaltener Zirkulation. Sie starb erst nach 1 Woche nach Beginn des Versuchs.

Eine nähere Diskussion dieses Versuchs soll erst weiter unten im Zusammenhang mit den anderen Versuchen vorgenommen werden.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:600000, 1:800000 und 1:1000000 Kobragift.

Um 8[10] p. m. des 23. IV. wurden je 3 Kaulquappen von 15 mm Länge in a) 1:600000, b) 1:800000 und c) 1:1000000 Kobragift übergeführt. Jede Lösung betrug 40 ccm. Temp. 14° C.

Um 10[10] p. m. des 23. IV. (also nach 2 Stunden) alle Kaulquappen in a), b) und c) noch ziemlich gut beweglich.

Um 11[10] a. m. des 24. IV. (also nach 15 Stunden) alle Kaulquappen in Lösung a) völlig unerregbar, aber sehr gut erhalten und mit lebhafter Zirkulation.

Um 11^{15} a. m. des 24. IV. 1 Kaulquappe in Lösung b) (1 : 800000) etwas beweglich, die 2 anderen völlig unbeweglich, aber gut aussehend. Etwas später auch die 3. Kaulquappe völlig gelähmt.

Um 11^{20} a. m. des 24. IV. Kaulquappen in c) noch beweglich, aber recht träge. Selbst um 10^{58} p. m. d. 24. IV. (also nach $26^1/_2$ Stunden) Kaulquappen in c) noch gelegentlich mit äußerst trägen, kriechenden Bewegungen, die aber am folgenden Morgen völlig aufhören.

Um 9^{00} p. m. des 24. IV., also 25 Stunden nach Beginn des Versuchs und wenigstens 9 Stunden nach Eintreten vollständiger Unerregbarkeit, wurden 2 Kaulquappen aus der Lösung b) (1 : 800000) in reines Wasser übergeführt. Diese blieben völlig unerregbar bis zum Abend des 26. IV., also noch ca. 48 Stunden, worauf die Erregbarkeit sehr langsam zurückkehrte. Am Morgen des 27. IV. waren sie immer noch recht träge und selbst am Abend dieses Tages noch nicht völlig erholt. Am Morgen des 28. IV. dagegen bewegten sie sich wieder völlig normal.

Von den Kaulquappen, die in den 3 Lösungen a), b), c) zurückgelassen wurden, zeigten die in c) (1 : 1000000) schon am 27. IV. wieder einen geringen Grad Erregbarkeit, ebenso am Abend des 28. IV. die in der Lösung b) zurückgelassene Kaulquappe und schließlich auch die in Lösung a) (1 : 600000) gelassenen Kaulquappen.

Die im letzten Versuche beschriebene Erscheinung, daß Kaulquappen in Lösungen, die nicht viel stärker sind als gerade zur vollständigen Lähmung hinreichen, schließlich wieder erregbar werden können, selbst wenn sie in den Lösungen dauernd verweilen, wenn auch sehr viel langsamer als nach der Übertragung in Wasser, könnte die Vermutung erwecken, daß die Kaulquappen sich allmählich an die Kobragiftlösungen in dem Sinne gewöhnen, daß nach längerer Zeit der Einwirkung eine höhere Konzentration des Kobragiftes zur Lähmung erforderlich ist als im Anfang der Wirkung. Diese Deutung ist aber nicht die richtige, da bei der Einführung neuer Kaulquappen z. B. in eine Lösung von 1 : 800000, in der die zuerst eingesetzten Kaulquappen wieder etwas erregbar geworden sind, auch die frisch eingeführten Kaulquappen nie vollständig gelähmt werden, sondern sogar stets etwas schwächere Lähmungserscheinungen aufweisen, als die zuerst eingesetzten im gleichen Zeitpunkte zeigen. Wenn man ferner Kaulquappen, die z. B. in einer Lösung von 1 : 800000 oder 1 : 1000000 völlig gelähmt worden sind, aber nach einigen Tagen wieder erregbar geworden, in frisch bereitete Lösungen von denselben Konzentrationen überführt, so tritt wieder vollständige Lähmung

ein. **Die ganze Erscheinung beruht also darauf, daß die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes in sehr verdünnten Lösungen, wahrscheinlich meist unter Mitwirkung von Bakterien, allmählich, wenn auch recht langsam, zersetzt werden.**

Versuch mit sehr jungen Kaulquappen in 1:500000 Kobragift.

Um 3^{45} p. m. d. 9. IV. 1910 5 Kaulquappen von R. fusca, die erst eine Länge von 12 bis 13 mm hatten (gleich nach Verlust der äußeren Kiemen), in 25 ccm Kobragiftlösung von 1:500000 gesetzt. Temp. der Lösung 13 bis 14° C.

Um 5^{00} p. m. (also nach $1^1/_4$ Stunden) schon recht träge.

Um 6^{50} p. m., d. h. 3 Stunden und 5 Minuten nach dem Beginn des Versuchs, 4 Kaulquappen bereits völlig gelähmt, die 5. noch etwas beweglich.

Um 7^{00} p. m. und später Zirkulation bei den völlig gelähmten Kaulquappen noch vorzüglich, und auch die Flimmerbewegung der Hautepithelzellen gut erhalten.

Um 8^{00} p. m. war auch die 5. Kaulquappe völlig gelähmt.

Am nächsten Morgen alle Kaulquappen noch mit vorzüglicher Zirkulation.

Dieser Versuch wurde nicht weiter protokolliert. In 2 gleichzeitig mit dem eben beschriebenen angestellten Versuchen mit Kaulquappen in 1:1000000 (25 ccm) und in 1:1500000 (38 ccm) Kobragift trat selbst nach vielen Tagen keine Lähmung ein; in der ersten Lösung zeigten sich die Kaulquappen nur etwas träge.

Bei Anwendung von nur 40 ccm Lösung und 4 Kaulquappen ist eine Lösung von 1:1000000 die schwächste, die vollständige Lähmung herbeiführt. Wenn man aber 200 bis 500 ccm Lösung und nur 4 bis 6 Kaulquappen zu den Versuchen verwendet, so erhält man nach 20 bis 30 Stunden bei 15 bis 18 mm langen Kaulquappen und einer Temperatur von 16 bis 20° C eine vollständige oder fast vollständige Lähmung noch bei einer Konzentration von 1:1500000, die aber nach 30 bis 40 weiteren Stunden unvollständig wird und in der Folge immer mehr, wenn auch langsam, abnimmt, was, wie schon oben hervorgehoben wurde, auf einer langsamen Zersetzung der wirksamen Bestandteile in der Lösung beruht, wodurch die Konzentration in der Außenlösung unter den kritischen Wert sinkt, wobei mit kritischer Konzentration die geringste Konzentration, die gerade ausreicht, vollständige Lähmung herbeizuführen, bezeichnet werden soll. Da in der

Zeit zwischen Beginn des Versuchs und dem Entstehen der Lähmung ebenfalls eine merkliche Konzentrationsänderung des wirksamen Bestandteils[1]) der Lösung stattfinden wird, so würde die wirkliche kritische Konzentration des Kobragiftes etwas niedriger als 1:1500000 liegen, und bei der Annahme, daß der wirksame Bestandteil nur 5 % des Kobragiftes (des gesamten getrockneten Sekrets) ausmacht, würde die kritische Konzentration dieses Bestandteils etwas weniger als 1:30000000 betragen.

Im vorhergehenden sind die Protokolle von nur einem kleinen Bruchteil der ausgeführten Versuche mitgeteilt; alle übrigen Versuche stimmten in ihren wesentlichen Ergebnissen mit den geschilderten überein, nur ist zu bemerken, daß die Kaulquappen in völlig gelähmtem Zustande weit länger leben können und sich regelmäßiger erholen bei Temperaturen unter 16° C als z. B. bei Temperaturen über 20° C. Bei Temperaturen von 22 bis 24° C sterben sie häufig noch in Lösungen von 1:600000 und selbst noch in 1:800000 schon 8 bis 10 Stunden nach Eintreten der Lähmung oder selbst noch früher. Die kritische Konzentration bleibt annähernd gleich für Kaulquappen zwischen 12 und 20 mm Länge, doch sind im allgemeinen Kaulquappen zwischen 15 und 18 mm die geeignetsten für Versuchszwecke. Sehr junge Kaulquappen scheinen für die lokalen Wirkungen der stärkeren Kobragiftlösungen auf die Hautepithelien etwas empfindlicher zu sein als etwas ältere (solche von 15 mm und darüber). Die ungünstige Wirkung höherer Temperaturen bei den Versuchen beruht wahrscheinlich wenigstens zum Teil darauf, daß bei dem gesteigerten Sauerstoffbedürfnis und der geringeren Konzentration des in der Lösung befindlichen freien Sauerstoffs (Abnahme des Absorptionskoeffizienten bei höherer Temperatur) die Kaulquappen bei aufgehobenen Atmungsbewegungen nicht mehr genügend mit Sauerstoff versehen werden. Dabei ist zu bemerken, daß die Lösungen vor Beginn der Versuche nur mit Luft, nicht mit reinem Sauerstoff gesättigt wurden.

---

[1]) Später mitzuteilende Versuche machen es wahrscheinlich, daß alle wichtigeren toxischen Wirkungen des Kobragiftes von einer einzigen Verbindung in demselben ausgehen.

Ehe wir zur Diskussion der aus den obigen Versuchen zu ziehenden Schlüsse schreiten, ist noch auf ein äußerst wichtiges Verhältnis aufmerksam zu machen. Es wird wohl aufgefallen sein, daß trotz des sehr geringen Gewichtes der bei den Versuchen verwendeten Kaulquappen (Kaulquappen von 12 bis 18 mm Länge wiegen in frischem Zustande nur ca. 12 bis 20 mg) relativ große Mengen Lösung (40 ccm oder darüber) in Anwendung kamen. Dies ist durchaus notwendig, wenn die Konzentration der Lösung während des Versuchs sich nicht wesentlich ändern soll. Es zeigte sich nämlich, daß eine sehr starke „Speicherung" des wirksamen Bestandteils des Kobragiftes von seiten der Kaulquappen erfolgt, d. h. daß im Zustande des Gleichgewichts zwischen dem Gehalt der äußeren Lösung und den Gehalten der verschiedenen Phasen, aus denen die Kaulquappen aufgebaut sind, an dem wirksamen Bestandteil des Giftes die mittlere Konzentration dieses Bestandteils (in gelöster und chemisch gebundener Form) im Kaulquappenkörper weit größer ist als in der die Kaulquappen umgebenden Lösung. Das Verhältnis der Konzentration der toxischen Verbindung in der Außenlösung zur mittleren Konzentration im Kaulquappenkörper ist zweifellos bei ungleich weit entwickelten Kaulquappen ein mehr oder weniger verschiedenes, da die Größenzunahme der Kaulquappen, wenn man letztere wie in unseren Versuchen nüchtern aufzieht, unter Aufzehrung und Assimilation des Dottermaterials größtenteils auf Wasseraufnahme beruht. Selbstverständlich wird im Zustande des Gleichgewichts im allgemeinen die Konzentration der toxischen Verbindung (in freier und chemisch gebundener Form) ebenso viele Ungleichheiten aufweisen, wie es Phasen von ungleicher Zusammensetzung im Aufbau der Kaulquappen gibt; deren mittlere Konzentration also z. B. nicht nur ungleich für das Blut, für die verschiedenen Kategorien Neurone und für eine quergestreifte Muskelfaser ausfallen, sondern auch ungleich sein in den einzelnen Phasen verschiedener Zusammensetzung, aus denen das Blut, die Muskelfasern und die verschiedenen Klassen der Neurone aufgebaut sind.

Daß eine starke Speicherung der toxischen Verbindung in den Kaulquappen im angedeuteten Sinne wirklich erfolgt, läßt sich äußerst einfach auf dem folgenden Wege nachweisen:

Man stelle 20 ccm Kobragiftlösung mit einer Konzentration von 1:150000 her, teile diese Lösung in 2 gleiche Portionen von je 10 ccm. Diese 2 Portionen seien bezeichnet als A und B. Man nehme nun ca. 60 kleine, lebende Kaulquappen, die zusammen ca. 1 g wiegen, in 9 g Wasser, so daß Kaulquappen und Wasser vereint 10 g wiegen. Man mische dieses Wasser nebst den darin enthaltenen Kaulquappen mit der Lösung A. Nach der Mischung mag diese neue Lösung A′ heißen. Die Kobragiftkonzentration in A′ ist dann im Anfang 1:300000.

Die Lösung B verdünne man mit 30 ccm Wasser, und sie sei nach dieser Verdünnung B′ genannt. Die Kobragiftkonzentration in B′ ist dann 1:600000. Man überführe nunmehr 2 oder 3Kaulquappen aus destilliertem Wasser in diese Lösung B′.

Innerhalb einiger Stunden werden die 2 oder 3 Kaulquappen in B′ vollkommen gelähmt, indem die Konzentration dieser Lösung trotz einer gewissen Verdünnung des Giftes infolge Speicherung desselben durch die Kaulquappen immer höher als der kritische Wert bleibt, weil das Verhältnis des Volumens der wenigen Kaulquappen zum Volumen der Lösung hier sehr klein ist. Dagegen kommt es niemals zu einer vollständigen Lähmung der 60 Kaulquappen in der ursprünglich konzentrierteren Lösung A′, weil sie so viel Gift aus der Lösung aufnehmen, daß die Konzentration der letzteren unter 1:1500000, d. h. unter den kritischen Wert sinkt.

Die Speicherung des toxischen Bestandteils des Kobragiftes durch verschiedene Gewebe und Zellen kann in analoger Weise bestimmt werden, indem man Kaulquappen als „quantitative Indicatoren" verwendet, wie im Kapitel IV für die roten Blutkörperchen gezeigt werden soll.

Wenn Gleichgewicht zwischen 15 mm langen Kaulquappen und einer sie umgebenden Lösung, die (nach eingetretenem Gleichgewicht) 1:1500000 Kobragift enthält, besteht, so ist die mittlere Konzentration des wirksamen Bestandteils in den Kaulquappenkörpern ca. 100mal größer als in der Außenflüssigkeit. Dabei kann die Konzentration dieses Bestandteils in freier oder chemisch gebundener Form in einzelnen Phasen der Kaulquappen vielleicht 10000mal höher, in anderen Phasen dagegen niedriger als in der Außenlösung sein. Die

Details dieser Versuche, die schon vor $1^1/_2$ Jahren in größerer Zahl ausgeführt wurden, finden sich an anderer Stelle publiziert.

Diskussion der Ergebnisse der in diesem Abschnitt mitgeteilten Versuche nebst einigen Zusätzen.

Wenn man das relativ rasche Eintreten der vollständigen Lähmung junger Kaulquappen selbst in sehr verdünnten Lösungen von Kobragift und gleichzeitig die starke Speicherung berücksichtigt, so ergibt sich, daß die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes außerordentlich leicht durch die Haut- und Kiemenepithelien der Kaulquappen in die pericapillaren Räume der Haut- und Kiemenblutgefäße diffundieren müssen, um ebenso schnell durch die Capillarendothelien in das Blut dieser Organe zu gelangen. Durch den Blutstrom weiter nach den Blutcapillaren der übrigen Organe geführt, exosmiert der größere Teil der giftigen Substanz durch die Capillarendothelien der einzelnen Organe zunächst in die intercelluläre Lymphe dieser Organe, um gleich weiter in die einzelnen Zellen, z. B. die verschiedenen Zellen des Zentralnervensystems, zu diffundieren und sich hier über die einzelnen Phasen dieser Zellen nach den Gesetzen der Diffusion in heterogenen Systemen zu verteilen, wobei die Verhältnisse vielleicht noch dadurch eine Komplikation erfahren, daß die giftige Substanz mit dem einen oder anderen Komponenten einer oder mehrerer Phasen dissoziierbare Verbindungen eingeht.

Enthalten die Kobragiftlösungen weniger als etwa 1:400000 oder 1:600000 Kobragift, so geschieht dies alles, ohne daß die Haut- und Kiemenepithelien irgendwie beschädigt werden.

Vergleichende Versuche über die Geschwindigkeit des Eindringens zeigen, daß, für gleiche Diffusionsgefälle zwischen Außenlösung und dem Blutplasma der Haut- und Kiemengefäße berechnet, die wirksamen Bestandteile des Kobragiftes mindestens ebenso schnell, wahrscheinlich sogar noch schneller durch die lebenden, unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien resp. durch die Capillarendothelien diffundieren müssen als Chloralhydrat[1]), dagegen etwas langsamer als die meisten anderen

[1]) Daß Chloralhydrat langsamer als die meisten anderen indifferenten Narkotica aufgenommen wird, hat Overton in seinen Studien über die Narkose gezeigt.

Narkotica. Das Eindringen muß sehr viel rascher sein als das von **Glycerin oder Harnstoff.**

Daß das Eindringen in den Körper wirklich durch die Haut- und Kiemenepithelien und nicht etwa vom Darmkanal aus erfolgt, ergibt sich ohne weiteres aus der Größe der Aufnahme während eines kürzeren Zeitraumes. Aus einer Lösung von 1 : 500000 Kobragift wird nämlich schon innerhalb 5 bis 6 Stunden von einer einzigen Kaulquappe eine Menge der toxischen Substanz aufgenommen, die erst in einem Volumen der Lösung enthalten ist, das 50 mal größer ist als das Volumen der Kaulquappe. Daß eine derartige Menge Lösung von einer Kaulquappe in 6 Stunden verschluckt werden soll, ist ausgeschlossen; ja es ist sehr unwahrscheinlich, daß eine Kaulquappe überhaupt trinkt außer mehr zufälligerweise bei der Aufnahme von fester Nahrung. Das für das Wachstum notwendige Wasser wird durch die Haut- und Kiemenepithelien aufgenommen. Im übrigen erfolgt die Aufnahme der toxischen Bestandteile des Kobragiftes ebenso leicht bei Kaulquappen schon in der ersten Zeit nach dem Ausschlüpfen aus der Eihaut, ehe überhaupt die Mundöffnung vorhanden, resp. ehe diese in Kommunikation mit dem Darmkanal getreten ist, wie durch spezielle Versuche festgestellt wurde.

Dieses sehr rasche Eindringen der wirksamen Substanz des Kobragiftes, das unzweifelhaft ein reiner Diffusionsvorgang ist, ohne daß dabei irgendwelche aktive Beteiligung des Protoplasmas der Kiemen- und Hautepithelien stattfindet, dürfte mit der weitverbreiteten Ansicht unvereinbar sein, daß diese Substanz zu den Proteinkörpern gehört. Eine Anhäufung von Amino- und Iminogruppen in einem Molekül, wie eine solche in den Proteinen besteht, benimmt nämlich dem Molekül die Fähigkeit, auf reinem Diffusionswege (d. h. ohne aktive Beteiligung des Protoplasmas) durch die lebende Plasmahaut zu dringen. Aus ähnlichen Gründen ist auch das Vorhandensein einer größeren Anzahl **Hydroxylgruppen** im Molekül der Substanz sehr unwahrscheinlich, es sei denn, daß die Zahl der Hydroxylgruppen von der der Kohlenstoffatome bei weitem übertroffen wird.[1]) Dagegen kann aus dem sehr raschen

[1]) Vgl. Overton in Nagels Handb. d. Physiol. 2, 819 bis 824, oder in Pflügers Archiv 92, 261 bis 264, 1902.

Eindringen keineswegs geschlossen werden, daß das Molekulargewicht der Substanz ein niedriges sein muß, da viele hoch molekularen Verbindungen (z. B. die basischen Anilinfarben, die freien Alkaloidbasen) die lebende Plasmahaut sehr leicht und rasch passieren, wenn nur keine zu große Anhäufung von Hydroxyl-, Amino- oder Iminogruppen im Molekül vorhanden ist.

Ein sehr wichtiges Ergebnis der Versuche ist, daß die Vergiftung durch Kobragift genau in demselben Sinne ein vollständig reversibler Vorgang ist wie z. B. eine normal verlaufende Narkose.

Wie bei der Narkose durch Äther oder Chloroform bedarf es zur vollständigen Lähmung des Zentralnervensystems durch Kobragift einer ganz bestimmten, angebbaren Minimalkonzentration der wirksamen Substanz in der Außenflüssigkeit, nachdem ein Gleichgewichtszustand zwischen dieser Konzentration und den Konzentrationen der Substanz in den verschiedenen Phasen, aus denen die Neurone aufgebaut sind, eingetreten ist.

Wenn die Konzentration der wirksamen Substanz in der Außenflüssigkeit unter den betreffenden Minimalwert sinkt, beginnt zunächst ein Teil des im Blutplasma der Kaulquappen befindlichen Giftes den Diffusionsgesetzen entsprechend durch die Haut- und Kiemenepithelien in die Außenflüssigkeit überzutreten, was seinerseits zu einem teilweisen Austritte des in den Neuronen und anderen Zellen der Kaulquappen enthaltenen Gifts in das Blut und zu einer allmählichen Entgiftung der Kaulquappen führt. Werden die Kaulquappen in reines und gelegentlich gewechseltes Wasser übergeführt, so wird die Entgiftung nach längerer Zeit eine ganz vollständige.

In einem gewissen Sinne kann man geradezu sagen, daß die Reversibilität bei der Intoxikation durch Kobragift eine noch weitergehende ist als bei der Narkose durch Chloroform oder selbst durch Äther, denn Äther bewirkt schon in einer Konzentration, die nur doppelt so hoch ist, als gerade zur vollständigen Narkose ausreicht, nach etwa 2 Stunden den Tod von Kaulquappen, wenn sie die ganze Zeit in der Lösung gelassen werden, während Kaulquappen oft in Kobralösungen, die selbst dreimal so stark sind, als zur völligen Lähmung des ganzen Zentralnervensystems

ausreichen würden, viele Tage am Leben bleiben können, wobei die Zirkulation während der ganzen Zeit fortdauert und die Kaulquappen bei der schließlichen Überführung in reines Wasser nach einigen Tagen sich vollkommen erholen können. Selbst nach Verweilen in Lösungen von 1 : 100 000, d. h. in Lösungen, die ca. 15 mal stärker sind als die, die schließlich zur vollständigen Lähmung führen würden, können Kaulquappen, besonders bei niedrigeren Temperaturen, mehr als 1 Stunde verweilen, ohne die Fähigkeit verloren zu haben, sich langsam völlig zu erholen; doch ist ein solcher Zeitraum (1 bis 2 Stunden) zu kurz für das Eintreten von Gleichgewicht zwischen der Konzentration in der Außenflüssigkeit und den Konzentrationen in den verschiedenen Phasen der Kaulquappen.

In der Tat zeigt die Intoxikation mit Kobragift, besonders wenn die Versuche so ausgeführt werden wie die unsrigen, große Ähnlichkeit mit der Narkose durch indifferente Narkotica. Die Hauptunterschiede liegen darin, daß Kobragift das Respirationszentrum schon in geringeren Konzentrationen als die Großhirnrinde lähmt, und daß bei Kobragift ein viel größeres Intervall zwischen den beiden niedrigsten Konzentrationen, die einerseits gerade zur Lähmung des Zentralnervensystems, andererseits zur Lähmung des Herzens ausreicht, liegt. Selbst zwischen den lokalen Wirkungen von Chloroform oder Äther und von Kobragift sind die Unterschiede nicht so groß, wie man aus der Literatur meinen könnte, denn konzentriertere Äther- und Chloroformlösungen töten alle Gewebezellen in sehr kurzer Zeit, bei Kaulquappen z. B. oft in weniger als 1 oder 2 Minuten, und es erfolgt rasch eine Disintegration der Hautepithelien usw. wie in konzentrierten Lösungen von Kobragift.

Einiger Worte der Erörterung bedarf die Erscheinung, daß bei der Kobravergiftung die Vergiftungssymptome der Kaulquappen nach ihrer Überführung aus der Lösung ins reine Wasser nur recht langsam zurückgehen, was besonders dann auffällt, wenn die Kaulquappen noch lange Zeit nach Eintreten der vollständigen Lähmung des Zentralnervensystems in solchen Kobragiftlösungen zurückgelassen worden sind, deren Konzentration weit mehr als ausreicht, diese vollständige Lähmung hervorzurufen (z. B. in Lösungen von 1 : 400 000 bis 1 : 600 000), ehe sie in reines Wasser übergeführt werden.

Dieses hängt mit der starken „Speicherung" der wirksamen Substanz des Kobragifts durch die Gewebezellen der Kaulquappen zusammen und ist eine notwendige Folge der Diffusionsgesetze in solchen heterogenen Systemen, wie sie von Kaulquappen, Fischen usw. repräsentiert werden. Da für alle Konzentrationen der toxischen Substanz die Gleichgewichtsbedingungen eine viel höhere mittlere Konzentration in den Neuronen (und anderen Gewebezellen) als im Blutplasma fordern, so kann bei jedem einzelnen vollständigen Kreislauf des Blutes nur ein sehr geringer Bruchteil des in den Neuronen angehäuften Giftes entfernt werden. Wenn wir die sehr plausible Annahme machen, daß diejenige Phase A (oder diejenigen Phasen A_1, A_2, A_3 usw.) der Neurone, deren durch das Gift veränderte Zusammensetzung die Vergiftungserscheinungen bedingen, das Gift in bedeutend höheren Konzentrationen aufnehmen als die andern Phasen B, C, D usw., aus denen die Neurone aufgebaut sind, so wird die vollständige Entfernung des Gifts aus den Neuronen eine viel langsamere sein müssen, als wenn bei gleichem Gesamtgehalte der Neurone an der toxischen Substanz, das Gift in allen Phasen der Neurone ungefähr gleichmäßig verteilt und gleich stark (durch „Lösungsaffinität" oder lose chemische Bindung) festgehalten wäre, und zwar um so langsamer, je mehr die Konzentration des Giftes gerade in der Phase A im Gleichgewichtszustande die Giftkonzentration im Blutplasma übertrifft. Ob die Phase A bloß ein viel besseres Lösungsmedium für die toxische Substanz als das Blutplasma darstellt und somit der physikalische Teilungskoeffizient dieser Substanz zwischen Blutplasma und der Phase A sehr zugunsten der Phase A ausfällt, oder ob die Phase A einen Komponenten enthält, der eine im Zustande der Dissoziation befindliche chemische Verbindung mit dem Gifte eingeht oder ob beide Annahmen zugleich erfüllt werden, ändert an dieser allgemein gehaltenen Betrachtung nichts; nur würde je nach Zutreffen der einen oder der anderen Annahme in verschiedenen Konzentrationsbereichen das jeweilige Verhältnis der Konzentrationswerte in der Phase A und im Blutplasma geringere oder größere Veränderungen während des Entgiftungsprozesses aufweisen. Die Entscheidung, ob eine in Wasser begrenzt

quellbare Verbindung oder Phase bei der Aufnahme einer fremden Substanz diese Substanz bloß in Form einer Lösung oder in Form einer chemischen Verbindung, die sich im Zustande der Dissoziation befindet, enthält, ist in vielen Fällen äußerst schwer zu entscheiden,[1]) besonders wenn auch die chemische Konstitution der fremden Substanz unbekannt ist; sie hat auch keine große Bedeutung, solange die etwa postulierte Verbindung nicht in reinem Zustande isoliert werden kann.

Das sehr langsame Zurückgehen eines Lähmungszustandes bei Kaulquappen, Fischen usw. nach Überführung dieser in reines Wasser beobachtet man stets auch bei einer echten Narkose, wenn der Teilungskoeffizient des indifferenten Narkoticums zwischen Wasser und den Gehirnlipoiden sehr stark zugunsten der letzteren ausfällt, z. B. etwa im Verhältnis 1:10000 oder 1:100000, wie dies bei solchen Verbindungen wie Phenanthren der Fall ist.[2])

Es verdient besondere Betonung, daß eine Kaulquappe, die bereits einmal durch Kobragift vollständig gelähmt und auch im gelähmten Zustande längere Zeit (mehrere Tage) gehalten worden ist, sich aber nach Überführung in reines Wasser allmählich erholt hat, durch gleiche oder ungefähr gleiche Konzentration des Kobragiftes wie beim erstenmal wieder vollständig gelähmt werden kann.

Dies mag im ersten Augenblick sehr auffallend erscheinen, da wenigstens Säugetiere nach wiederholter Injektion von Kobragift allmählich eine gewisse Immunität erwerben. Es ist zwar noch nicht bewiesen, daß Amphibien Antivenine bilden können, aber doch recht wahrscheinlich, wenn auch die Bildung derselben wegen der niedrigen Körpertemperatur vermutlich langsamer erfolgen wird als bei den Säugetieren. Es muß aber zunächst hervorgehoben werden, daß Kaulquappen aus einer Lösung nicht alle Bestandteile des Kobragiftes aufnehmen, sondern wahrscheinlich nur die eigentlichen giftigen Bestandteile. Nun ist gar nicht bewiesen, daß es gerade diese giftigen Be-

[1]) Diese Schwierigkeiten werden von vielen Biologen infolge mangelnder theoretischer Bildung häufig völlig übersehen. Ein Beispiel dafür liefern unter anderen die Untersuchungen von Kyes „Über die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden".

[2]) Vgl. z. B. Overton, Studien über die Narkose. S. 125 u. 126.

standteile sind, die die Antiveninbildung auslösen. Forßmann und Bang[1]) haben bei der immunisatorischen Hämolysinbildung gefunden, daß es nicht das Toxin ist, das die Bildung von Schutzkörpern veranlaßt, sondern eine andere Substanz (das Lysogen).

Aber selbst wenn speziell bei der Bildung von Antiveninen die giftigen Bestandteile des Kobragiftes es sind, die die Antiveninbildung auslösen, wäre der Umstand, daß Kaulquappen bei einer wiederholten Vergiftung von derselben Konzentration des Kobragiftes wie beim ersten Male gelähmt werden, kein Beweis, daß die Kaulquappen keine Antivenine bilden, denn die Immunität beruht wahrscheinlich ausschließlich auf der Bindung eines größeren Teils des ins Blut gebrachten Toxins durch die Antikörper und nicht darauf, daß die Gewebezellen nach der Immunisierung erst durch eine höhere Konzentration des freien im Blute zirkulierenden Toxins affiziert werden. Solange aber die Konzentration der (freien) wirksamen Substanz des Kobragiftes in der Außenlösung konstant erhalten wird, muß, gleichgültig wieviel des Giftes im Körper der Kaulquappen von Immunkörpern gebunden wird, die Konzentration des nicht gebundenen Anteiles des Giftes im Blutplasma schließlich (im Gleichgewichtszustande) im wesentlichen den gleichen Wert erreichen und sich nur mit der Änderung der Giftkonzentration in der Außenlösung ändern.

Eben weil es wahrscheinlich ist, daß die unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien von Kaulquappen und Fischen nur die eigentlich toxisch wirkende Komponente des Kobragifts durchlassen, nicht aber die übrigen Bestandteile desselben, so würde es in der Tat von großem Interesse sein, festzustellen, ob bei dieser Art der Aufnahme der toxischen Substanz Antivenine von Kaulquappen und Fischen gebildet werden oder nicht, da, wenn ja, eine große Wahrscheinlichkeit bestehen würde, daß in diesem Falle die toxische Substanz selber die Bildung des Antivenins auslöst, während bei der Einspritzung einer Kobragiftlösung in ein Tier außer der eigentlichen toxischen Substanz alle andern Bestandteile des Sekrets der Giftdrüsen in das Versuchstier gelangen und es

---

[1]) Bang und Forßman, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 238, 1906.

somit unbestimmt bleibt, ob es die toxische Substanz selber oder irgend eine andre im Giftsekret vorkommende Verbindung ist, die die Antiveninproduktion auslöst.

Doch bleibt die Möglichkeit bestehen, daß ein vom Toxin verschiedenes Antigen ebenso wie das Toxin durch die Haut durchdringen könnte, analog wie Forßman[1]) die Permeabilität des Hämolysin-Antigens durch Kollodiumkapseln erwiesen hat.

II. Kapitel.

Über den Einfluß verschiedener Salze, besonders der Kalksalze, auf die Wirkungsstärke des Kobragiftes. Einfluß von Blutserum.

Während seiner Untersuchungen über die Hämolyse durch Kobragift hatte Bang[2]) gefunden, daß die Gegenwart verschiedener Salze in den das Kobragift enthaltenden Lösungen großen Einfluß auf das Eintreten oder Nicht-Eintreten der Hämolyse ausübt. Bald darauf (im Frühling 1909) konnte Overton auch bei der Vergiftung von Kaulquappen (und Fischen) durch Kobragift nachweisen, daß besonders ein Zusatz von Kalksalzen zu Kobragiftlösungen, in die Kaulquappen gebracht werden, die Giftigkeit dieser Lösungen sehr stark herabsetzen kann, und zwar um so stärker, je höher der Gehalt der Kalksalze in der Lösung steigt, sofern die Konzentration der Kalksalze nicht so hoch gewählt war, daß dieselbe auch ohne Kobragift schädliche Wirkungen auf die Kaulquappen ausgeübt haben würde.

Wir haben die Versuche in diesem Jahre (1910) wiederholt und mannigfach variiert und geben hier nach Mitteilung einiger Versuchsprotokolle die Hauptresultate der Versuche.

1. Versuche mit Kalksalzen, besonders Calciumchlorid.

Die meisten Versuche wurden mit Calciumchlorid angestellt, wobei wir Kahlbaums krystallisiertes Präparat $CaCl_2 + 6H_2O$ verwendeten. Dieses Präparat reagiert völlig neutral, während das geschmolzene wasserfreie Salz immer deutlich alkalisch reagiert, was, wie sich später zeigen wird, für die Versuche nicht gleichgültig sein kann. Die Stammlösung wurde titriert und die in den Versuchen angegebenen

[1]) Forßman, diese Zeitschr. 9, 330, 1908.
[2]) Bang, diese Zeitschr. 18, 441, 1909.

Konzentrationen sind auf das krystall- und wasserfreie Salz $CaCl_2$ umgerechnet.

Vorversuche mit $CaCl_2$-Lösungen ohne Kobragift zeigten, daß selbst in einer 1%igen Lösung (isotonisch mit ca. 0,7%iger NaCl-Lös.) Kaulquappen über 24 Stunden am Leben bleiben, daß aber ihre Bewegungen in dieser Lösung schon nach 12 Stunden etwas träge werden, um nach etwa 30 Stunden aufzuhören, wonach die Kaulquappen bald sterben. In 0,5%iger reiner $CaCl_2$-Lösung leben Kaulquappen wenigstens 50 Stunden und in 0,3%iger über eine Woche, ohne Abnormalitäten aufzuweisen.

Versuch mit Kaulquappen in 1:13000 Kobragift in ½%iger $CaCl_2$-Lösung.

Um 8^{15} p. m. des 9. IV. 3 Kaulquappen von Rana fusca (12 bis 13 mm lang) kurz nach Verlust der äußeren Kiemen in genannte Lösung gesetzt (Temp. während des Versuchs 13 bis 15° C).

Um 11^{50} p. m. des 9. IV. noch ziemlich gut beweglich.

Um 11^{30} a. m. des 10. IV. 2 Kaulquappen ebensogut beweglich wie am Abend vorher, die dritte schwächliche unbeweglich und wohl tot.

Um 10^{40} p. m. des 10. IV. 2 Kaulquappen noch etwas beweglich aber sehr träge, sonst gut aussehend. Am 13. IV. tot.

In diesem Versuch ist die Konzentration des Kobragifts mehr als 100mal höher als sonst zur vollständigen Lähmung von Kaulquappen ausreicht, und ohne den $CaCl_2$-Zusatz würden sie schon nach 5 bis 10 Minuten gestorben sein, um sich bald darauf zu desintegrieren.

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift mit 0,33%igem $CaCl_2$ (A), mit 0,2%igem $CaCl_2$ (B) und mit 0,15%igem $CaCl_2$ (C).

Beginn der 3 Versuche 12^{03} a. m. des 13. IV. Je 3 Kaulquappen verwendet.

Um 3^{30} p. m. des 13. IV. (also nach mehr als 15 Stunden) alle 3 Kaulquappen in B und C und 2 in A recht lebhaft und gesund.

Um 7^{30} p. m. des 14. IV. alle Kaulquappen in B und C gesund und lebhaft, ebenso 2 in A, die ihr totes Geschwister aufgefressen haben.

Alle diese Kaulquappen blieben während mehr als 1 Woche gesund, worauf die Versuche abgebrochen wurden. Ohne $CaCl_2$-Zusatz wären die Kaulquappen nach ca. 10 Minuten völlig gelähmt gewesen und nach weniger als 1 Stunde tot (vgl. S. 248). Die zu diesen Versuchen verwendeten Kaulquappen waren erst 12 mm lang, und solche sind auch noch etwas empfindlicher gegen Kobragift als etwas ältere.

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift mit 1:1000 $CaCl_2$.

Um 8^{00} p. m. des 2. VI. 3 Kaulquappen in diese Lösung gesetzt.

Um 11^{25} p. m. alle 3 Kaulquappen völlig gesund.

Um 1[20] p. m. des 3. VI. 2 noch lebhaft beweglich, die dritte träge.

Um 8[25] p. m. des 3. VI. 1 Kaulquappe bewegungslos, die 2 anderen ziemlich träge (Temp. 19° C).

Am Abend des 4. VI. 2 Kaulquappen noch ziemlich gut beweglich. Versuch abgebrochen.

Alle die folgenden Versuche mit Kobragift und $CaCl_2$-Lösungen wurden angestellt, um zu ermitteln, wie weit die Giftigkeit von Kobragiftlösungen herabgesetzt wird durch derart verdünnte $CaCl_2$-Lösungen, wie sie etwa im Blutplasma vorkommen.

Versuche mit 1:100000 Kobragift in 1:3000 $CaCl_2$.

Um 8[07] p. m. des 4. VI. zwei 18 mm lange Kaulquappen in die Lösung gesetzt (Temp. 20½° C).

Um 11[58] p. m. des 4. VI. beide Kaulquappen noch beweglich, aber entschieden träger als normal.

Um 2[00] p. m. des 5. VI. beide noch etwas beweglich, wenn gereizt, aber sehr schnell ermüdend, kaum spontan beweglich, ebenso um 10[20] p. m. des 5. VI.

Um 2[00] p. m. des 6. VI. 1 Kaulquappe noch ziemlich gut reizbar, die andere sehr schwer. Versuch abgebrochen.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 1:5000 $CaCl_2$.

Um 6[45] p. m. des 3. VI. 2 Kaulquappen in diese Lösung gesetzt.

Um 11[50] p. m. des 3. VI. beide Kaulquappen beweglich, aber etwas träge.

Um 3[35] p. m. des 4. VI. beide noch etwas beweglich, aber äußerst träge.

Um 11[59] p. m. des 4. VI. unbeweglich, aber eben merklich reizbar.

Um 2[10] p. m. des 5. VI. beide völlig unerregbar, aber mit gut erhaltener Zirkulation.

Am 8. VI. beide tot (Temp. während des Versuchs 19½ bis 23° C).

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 1:10000 $CaCl_2$.

Um 8[07] p. m. des 4. VI. 2 Kaulquappen in die Lösung gebracht. Temp. 20½° C.

Um 11[59] p. m. des 4. VI. beide noch beweglich, aber träge.

Um 1[55] p. m. des 5. VI. beide völlig unerregbar, aber Zirkulation bei beiden noch lebhaft. Am Abend war die Zirkulation bei der einen schwach geworden, so daß die Schwanzcapillaren nicht mehr durchblutet waren. Am folgenden Tage beide tot.

Versuch mit 1:400000 Kobragift in 1:5000 $CaCl_2$.

Um 6[45] p. m. des 3. VI. 3 Kaulquappen in die Lösung gesetzt (Temp. 19½° C).

Um 11[50] p. m. des 3. VI. alle noch gut beweglich.

Um 3[40] p. m. und 11[57] p. m. des 4. VI. alle noch gut beweglich, höchstens etwas träger als normal. Ebenso am 5. und 6. VI. Versuch nicht weiter protokolliert.

Versuch mit 1:400000 Kobragift in 1:10000 $CaCl_2$.

Um 6^{45} p. m. des 3. VI. 2 Kaulquappen eingesetzt (Temp. $19^1/_2$° C).

Um 11^{50} p. m. beide noch beweglich. In den folgenden Tagen blieben die Kaulquappen beweglich, aber mehr oder weniger träge.

Selbst Lösungen, die nur einen Teil $CaCl_2$ in 50000 Wasser enthalten, setzen die Toxizität von Kobralösungen sehr deutlich herab; Kaulquappen werden z. B. nicht mehr völlig gelähmt, wenn zu diesen Lösungen 1:1000000 Kobragift zugesetzt wird, und bei etwas größerem Zusatz von Kobragift treten die Vergiftungssymptome langsamer ein als bei Lösung derselben Menge Gift im gleichen Volumen reinen Wassers.

Bei sehr jungen Kaulquappen muß man etwas größere Mengen $CaCl_2$ zu Kobragiftlösungen von verschiedener Konzentration zusetzen, um sie vor der Giftwirkung zu schützen, als bei älteren Kaulquappen, wie überhaupt Kaulquappen in den ersten Tagen nach dem Ausschlüpfen empfindlicher sind.

Versuche mit anderen Kalksalzen zeigten, daß auch diese die Toxizität von Kobragiftlösungen stark herabsetzen, doch wurden keine genaueren quantitativen Versuche mit denselben angestellt. Nur solche Salze, die, wie äthylschwefelsaures Calcium, keine merkliche hydrolytische Dissoziation aufweisen, sind direkt vergleichbar mit $CaCl_2$, da, wie die folgenden Versuche zeigen werden, $Ca(OH)_2$-Lösungen die Toxizität von Kobragiftlösungen bedeutend stärker herabsetzen als $CaCl_2$-Lösungen von gleichem molekularem Gehalt. Calciumchloridlösungen setzen die Toxizität von Kobragiftlösungen für Fische in derselben Weise und in ungefähr gleichem Grade herab wie für Kaulquappen.

Versuche über den Einfluß sehr verdünnter $Ca(OH)_2$-Lösungen auf die Toxizität von Kobragiftlösungen.

Es ist zunächst vorauszuschicken, daß Kaulquappen sehr empfindlich sind gegen alkalische Lösungen, selbst sehr verdünnte. Sie vertragen höchstens eine Lösung von 1:5000 Na_2CO_3; ja werden auf die Dauer davon meist beschädigt wie nicht selten selbst durch eine Lösung von 1:7500; dagegen vertragen sie eine Lösung von 1:10000 Na_2CO_3 beliebig lange. Auch von Lösungen von 1:25000 $Ca(OH)_2$ werden Kaulquappen häufig etwas beschädigt, nicht mehr aber von Lösungen von 1:50000 $Ca(OH)_2$.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:25000 Kobragift und 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:50000 Kobragift.

Um 2^{33} p. m. des 13. IV. 1910 je 4 Kaulquappen gesetzt in:

A. 25 ccm einer Lösung, die 1:25000 $Ca(OH)_2$ + 1:25000 Kobragift enthielt,

B. 25 „ „ „ „ „ „ + 1:50000 „ „

Um 3^{33} p. m. alle Kaulquappen in A und B noch gut beweglich.

Um 5^{33} p. m. alle träge, aber mehr oder weniger beweglich.

Um 6^{33} p. m. Kaulquappen in A sehr wenig beweglich, Schwanzflosse beschädigt und teilweise abgelöst. Kaulquappen in B sehr träge, aber sonst gut erhalten.

Um 7^{10} p. m. alle Kaulquappen in A tot, die in B träge, sonst gut erhalten.

Um 8^{10} p. m. Kaulquappen in B sehr träge.

Um 11^{30} p. m. kaum noch beweglich, Aussehen normal.

Um 9^{00} a. m. des 14. IV. auch die Kaulquappen in B alle tot.

Versuch mit Kaulquappen in Lösungen von 1:50000 $Ca(OH)_2$ + 1:50000 Kobra, 1:100000 Kobra, 1:200000 Kobra und 1:400000 Kobra.

Um 12^{55} p. m. des 30. V. 1910 wurden je 2 Kaulquappen in:

A.	40 ccm einer Lösung mit 1:50000 $Ca(OH)_2$	+ 1:50000	Kobragift,
B.	40 „ „ „ „ 1:50000 „	+ 1:100000	„
C.	40 „ „ „ „ 1:50000 „	+ 1:200000	„
D.	40 „ „ „ „ 1:50000 „	+ 1:400000	„

gesetzt.

Um 8^{00} p m. des 30. V. Kaulquappen in A und B etwas träge, die in C und D noch lebhaft.

Um 10^{00} a. m. des 31. V. Kaulquappen in A und B träge, die übrigen gesund.

Um 4^{00} p. m. des 31. V. Kaulquappen in A tot, die in B sehr träge, die in C und D noch lebhaft.

Um 8^{00} a. m. des 1. VI. Kaulquappen in B tot; die in C und D noch lebhaft.

Am 2. VI. Kaulquappen in C und D noch lebhaft. Versuch abgebrochen.

Aus diesen Versuchen sehen wir, daß $Ca(OH)_2$ die Giftigkeit von Kobragiftlösungen noch viel stärker herabsetzt als äquivalente Konzentrationen von $CaCl_2$.

Versuche mit Kobragift + Soda zeigen, daß Soda die Vergiftungserscheinungen ziemlich stark verzögert, aber die Konzentration der Grenzlösung (= schwächste Lösung, die eine vollständige Lähmung der Kaulquappen bewirkt) viel weniger herabsetzt als entsprechende Lösungen von $Ca(OH)_2$.

Versuch mit Kaulquappen in 1:5000 Soda + 1:50000 Kobragift und in derselben Konzentration von Soda + 1:100000 Kobragift.

Um 2^{10} p. m. des 15. IV. 1910 je 5 Kaulquappen in eine Lösung, die bestand aus:

A. 25 ccm 1:5000 Soda + 1:50000 Kobragift,
B. 25 „ 1:5000 „ + 1:100000 „

gesetzt.

Um 3^{00}, 5^{10}, 8^{20} und 10^{00} p. m. des 15. IV. Nichts Abnormales zu bemerken.

Um 1^{00} p. m. des 16. IV. Kaulquappen sowohl in A wie in B träge.

Um 5^{30} p. m. alle gestorben. (Temp. um 20° C.)

Bei Anwendung von nur 1:10000 Soda und denselben Konzentrationen von Kobragift starben die Kaulquappen viel rascher.

Versuch: Um 10^{40} a. m. des 31. V. 1910 wurde je eine Kaulquappe in:

A. 40 ccm 1:10000 Soda + 1:200000 Kobragift,
B. 40 „ 1:10000 „ + 1:400000 „;

gesetzt.

Um 8^{00} p. m. des 31. V. beide Quappen noch gut beweglich.

Um 8^{00} a. m. des 1. VI. Kaulquappen in A unberweglich, aber Zirkulation noch erhalten, ebenso um 10^{00} a. m. des 1. VI.; Kaulquappen in B noch gut beweglich.

Um 10^{30} a. m. des 2. VI. Kaulquappen in A tot mit abgelösten Epithelien. Kaulquappen in B blieben während mehrerer Tage gut beweglich.

Lösungen von 1:50000 MgO schädigen Kaulquappen nicht, aber setzen auch die giftigen Wirkungen von Kobragift sehr wenig herab, wie der folgende Versuch zeigt:

Versuch: Um 7^{30} p. m. des 15. IV. 1910 wurden je 4 Kaulquappen in:

A. 25 ccm Lösung von 1:50000 MgO + 1:50000 Kobragift,
B. 22 „ „ „ 1:50000 „ + 1:100000 „;

gesetzt.

Bereits um 8^{00} p. m. des 15. IV. waren 3 Kaulquappen in A unbeweglich, die dritte sehr träge und die Kaulquappen in B alle recht träge.

Um 9^{00} p. m. des 15. IV. alle Kaulquappen in A tot, 2 in B noch etwas beweglich.

Um 9^{30} p. m. alle Kaulquappen in B ebenfalls tot.

Über den Einfluß eines Zusatzes von Kochsalz und von Magnesiumchlorid auf die Toxizität von Kobragiftlösungen.

Während Zusatz von kleinen Mengen Kalksalzen einen so außerordentlich großen Einfluß auf die Toxizität von Kobragiftlösungen auf Kaulquappen ausübt, ist der Einfluß von Magnesiumchlorid und von Natriumchlorid sehr gering, wenn auch ganz deutlich bei Anwendung von mehrpromilligen Lösungen. Auch dies gilt ebenso für Fische. Es wird genügen, je einen Versuch mit diesen beiden Salzen anzuführen, wobei vorauszuschicken ist, daß diese Salze in gleichen Konzentrationen ohne Kobragift wenigstens während einiger Tage Kaulquappen und Frösche nicht schädigen.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 0,5%igen kryst. Magnesiumchloridlösungen ($MgCl_2 + 6\,Aq$).

Um 6^{15} p. m. des 27. IV. sieben 15 mm lange Kaulquappen von R. fusca in obige Lösung gesetzt. Temp. 13 bis 14° C.

Um 8^{35} p. m. des 27. IV. alle noch ziemlich gut beweglich.

Um 12^{03} a. m. des 28. IV. alle völlig unerregbar, aber Zirkulation noch gut erhalten. Hautepithelien etwas angegriffen.

Um 8^{00} p. m. des 28. IV. keine Zirkulation mehr, Hautepithelien weniger stark angegriffen als in einer Kobragiftlösung von derselben Konzentration ohne Zusatz von Magnesiumchlorid.

Versuch mit 1:200000 Kobragift in 0,6%iger Kochsalzlösung.

Um 6^{17} p. m. des 27. IV. vier Kaulquappen von 15 mm Länge in obige Lösung gesetzt.

Um 12^{05} a. m. des 28. IV. (also nach fast 6 Stunden) alle noch mehr oder weniger beweglich.

Um 3^{20} p. m. des 28. IV. (ca. 21 Stunden nach Beginn des Versuchs) alle unerregbar, aber Körper sehr gut erhalten.

Um 8^{10} p. m. des 28. IV. Zirkulation noch gut erhalten, nur etwas träge. Epithelien unbeschädigt. Am 29. IV. waren die Kaulquappen noch am Leben, am 30. IV. dagegen tot.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß relativ starke Lösungen von Magnesiumchlorid die Toxizität des Kobragifts nur um ca. 50% herabsetzen und sich in dieser Hinsicht mehr als hundertmal weniger wirksam zeigen als gleichkonzentrierte Lösungen von $CaCl_2$, und daß selbst 0,6%ige NaCl-Lösungen die Toxizität nur auf zirka zwei Drittel des ursprünglichen Werts reduzieren.

Ringer-Lösung (0,6% NaCl, 0,02% KCl, 0,03% $CaCl_2$) setzt die Giftigkeit etwas stärker herab, als man nach dem Verhalten einer 0,6%igen NaCl- und einer 0,03%igen $CaCl_2$-Lösung erwarten könnte; so blieben Kaulquappen in 1:50000 Kobragift in Ringer-Lösung gelöst während 48 Stunden mehr oder weniger beweglich, wenn auch freilich träger als normal.

Versuche über das Verhalten von Kaulquappen in Blutserum mit und ohne Zusatz von Kobragift und Kobragift + $CaCl_2$.

Es mußte von Interesse sein, den Einfluß von Blutserum auf die Toxizität des Kobragifts zu erfahren. Es ist dies aber nicht ganz einfach, weil Blutserum von Säugetieren selber einen schädlichen Einfluß auf Kaulquappen ausübt. Unverdünntes Serum von Säugetieren bewirkt, ähnlich 0,9 bis 1,0%iger NaCl-Lösung,

schließlich den Tod durch Wasserentziehung; bei Kaulquappen von mehr als ca. 15 mm Länge wird diese wasserentziehende Wirkung erst nach vielen Stunden deutlich. Aber auch nach Verdünnung mit Wasser, bis der osmotische Druck nur dem einer 0,5 bis 0,6 $^{0}/_{0}$ igen Kochsalzlösung entspricht, wirkt frisches Serum allmählich tödlich auf Kaulquappen, und zwar Serum von verschiedenen Tieren in sehr ungleichem Grade, während 0,6 $^{0}/_{0}$ iges NaCl nicht schädlich wirkt. Ochsenblutserum wirkt vielmals schädlicher als Pferdeblutserum, welch letzteres nach Verdünnung mit dem halben Volumen Wasser bei 14 bis 16° C Kaulquappen erst nach ca. 30 bis 40 Stunden tötet und in den ersten 20 Stunden dieselben kaum merklich affiziert. Ochsenserum, selbst nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser, wirkt dagegen stark schädlich schon nach weniger als 3 Stunden und tödlich innerhalb 12 Stunden oder weniger. Diese Unterschiede zwischen Pferde- und Ochenserum wurden bei allen untersuchten Blutproben gefunden.

Es ist von großem Interesse, daß durch Erwärmung von Ochsenblutserum auf 56 bis 58° C während ca. [illegible]nuten, also unter denselben Umständen, die zur Zerstörung der Alexine führt, die spezifisch schädliche Wirkung des Ochsenblutserums so gut wie gänzlich aufgehoben wird. Da diese Tatsache, die bei den Vorversuchen mit Sera gefunden wurde, eine größere methodische Bedeutung gewinnen kann, mögen einige Versuchsprotokolle, die diese Verhältnisse klarlegen, mitgeteilt werden.

Versuche mit Kaulquappen in frischem, mit Wasser verdünntem Ochsenblutserum.

A. Um 8^{05} p. m. des 21. IV. 1910 mehrere Kaulquappen von 13 und von ca. 16 mm Länge in ein Gemisch von 25 ccm frisches, ungeheiztes Ochsenserum (ca. 7 Stunden nach Schlachten des Tiers) + 25 ccm Wasser in einer bedeckten Krystallisierschale gesetzt (Flüssigkeitsschicht ca. 4 mm hoch.[1])

Um 11^{58} p. m. des 21. IV. (also nach ca. 4 Stunden) alle Kaulquappen noch beweglich, aber träge und geschrumpft aussehend.

[1]) Bei Versuchen mit Kaulquappen im Serum ist es stets geraten, eine Flüssigkeitsschicht von nur wenigen Millimetern Höhe anzuwenden, da sonst Sauerstoffmangel eintreten kann.

Am nächsten Morgen (22. IV.) alle Kaulquappen tot und stark geschrumpft.

B. Um 11^{00} p. m. des 21. IV. sechs jüngere und ältere Kaulquappen aus derselben Brut in 40 ccm Serum von demselben Tier + 25 ccm Wasser, nachdem das Serum vorher während 40 Minuten auf 56 bis 58° C im Wasserbade erwärmt und darauf langsam abgekühlt wurde. Am nächsten Morgen waren alle Kaulquappen gut beweglich und nicht geschrumpft. Ebenso um 8 p. m. des 22. IV. und um 7 p. m. des 23. IV.

Diese Versuche zeigen das typische Verhalten von Kaulquappen in nicht erwärmtem und vorher erwärmtem Ochsenserum. Die Schrumpfung der Kaulquappen (schon vor dem Tode) in dem schädlichen Serum ist eine regelmäßige Erscheinung und dürfte darauf beruhen, daß die Haut- und Kiemenepithelien durch das schädliche Serum so weit verändert werden, daß sie für Natriumchlorid, aber nicht für die Eiweißstoffe des Serums durchlässig werden. Unter solchen Umständen müßte eine Schrumpfung stattfinden, wenn der partiale osmotische Druck der Eiweißkörper im Serum größer ist als derjenige des Blutplasmas und der Gewebelymphe der Kaulquappen.

Ochsenblutserum, wenn nicht vorher auf ca. 56° erwärmt (die niedrigste Temperatur, welche zur Zerstörung der schädlichen Stoffe im Serum hinreicht, wurde noch nicht ermittelt), wirkt noch bei ziemlich starker Verdünnung mit Wasser und Ringer-Lösung schädlich auf Kaulquappen, aber natürlich langsamer als weniger verdünntes Serum. In einem Versuche z. B. mit 20 ccm frischem Ochsenserum + 25 ccm Wasser + 100 ccm Ringer-Lösung (mit 0,65 % NaCl, 0,02 % KCl und 0,03 % $CaCl_2$) waren alle 6 zum Versuche verwendeten Kaulquappen nach 4 Stunden noch ziemlich gut beweglich, aber bereits deutliche Anzeichen einer beginnenden Lähmung vorhanden. Nach 10 weiteren Stunden waren alle noch immer etwas beweglich, aber stark affiziert. Nach 24 Stunden vom Beginne des Versuchs waren alle fast oder ganz unerregbar und 12 Stunden später tot.

Auf die schädlichen Wirkungen von vorher nicht erhitztem Serum auf Kaulquappen hat ein Zusatz von $CaCl_2$ entweder keinen oder einen sehr geringen Einfluß, so war z. B. die Beweglichkeit von Kaulquappen in einem Gemisch von gleichen Volumina Kalbsblutserum und 0,4 % $CaCl_2$ schon nach 1 Stunde deut-

lich, nach $3^1/_2$ Stunde sehr stark beeinträchtigt. Nach 12 Stunden (vom Beginne des Versuchs) waren alle tot.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß man behufs Feststellung des Einflusses von Serum auf die Toxizität von Kobragift, sofern man Kaulquappen als Indicatoren verwenden will, entweder ein solches Serum wie Pferdeblutserum, das nur langsam eigene schädliche Wirkungen ausübt, oder aber vorher auf 56° C erwärmtes Serum verwenden sollte. Bisher wurde nur der erste Weg eingeschlagen. Es mögen die folgenden abgekürzten Versuchsprotokolle mitgeteilt werden.

Versuche mit Kaulquappen in mit Wasser etwas verdünntem Pferdeblutserum, mit und ohne Zusatz von Kobragift.

A. Um 11^{50} p. m. des 29. IV. 8 Kaulquappen (von 15 mm Länge) nach längerem Verweilen in mehrfach gewechseltem, sterilisiertem Wasser in ein Gemisch von 50 ccm Pferdeblutserum + 30 ccm dest. Wasser gesetzt (Flüssigkeitsschicht nur ca. 5 mm hoch). Temp. 11 bis 12° C.

Um 11^{30} a. m. des 30. IV. (also nach fast 12 Stunden) alle 8 Kaulquappen vollkommen gesund aussehend und gut beweglich, nicht im geringsten geschrumpft.

Um 6^{45} p. m. des 1. V. (ca. 42 Stunden nach Beginn des Versuchs) 2 Kaulquappen, noch ziemlich gut beweglich und mit gut erhaltener Zirkulation, die 6 andern unbeweglich, aber mit sehr gut erhaltenen Epithelien, keine Zirkulation in diesen Kaulquappen zu erkennen. Serum noch völlig geruchlos.

B. Um 12^{10} a. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in 1:50000 Kobragift, das in 40 ccm einer Mischung von 25 ccm Serum (von demselben Pferdeblut wie bei A) + 15 ccm dest. Wasser gelöst wurde, gesetzt.

Um 10^{50} a. m. des 30. IV. (also nach ca. $10^1/_2$ Stunden) alle Kaulquappen völlig unerregbar, aber Zirkulation noch gut erhalten und Kaulquappen sonst gut aussehend, nicht im geringsten geschrumpft.

Um 6^{47} p. m. des 1. V. alle Kaulquappen tot und Körper stark geschrumpft.

C. Um 12^{13} a. m. des 30. IV. 3 Kaulquappen in 1:100000 Kobragift in eine Mischung von 25 ccm Pferdblutserum (von demselben Pferde wie bei A) + 15 ccm dest. Wasser gelöst, übergeführt.

Um 10^{55} a. m. des 30. IV. (also nach 10 Stunden 40 Minuten) Kaulquappen völlig unerregbar, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation und auch sonst sehr gut aussehend, keine Schrumpfung.

Um 6^{50} p. m. des 1. V. alle Kaulquappen tot, aber Körper besser erhalten als bei den Kaulquappen in B zu derselben Zeit.

D. und E. Um 2^{30} p. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in 1:200000 Kobragift in einem Gemisch von 25 ccm Pferdeserum + 15 ccm. dest.

Wasser gelöst und 4 andere Kaulquappen (E) in 1:400000 **Kobragift** gelöst, in ein Gemisch von gleichen Teilen Serum und Wasser gesetzt.

Um 10^{10} p. m. des 30. IV. alle Kaulquappen in D und E gut beweglich, ebenso um 10^{30} a. m. des 1. V.

Um 7^{00} p. m. des 1. V. einzelne Kaulquappen in D und E noch beweglich, aber träge, die andern unbeweglich, aber mit sehr gut erhaltenem Körper.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß Pferdeblutserum die Toxizität von Kobragift ungefähr in demselben Grade herabsetzt wie eine Salzlösung mit gleichem NaCl- und $CaCl_2$-Gehalt. Einen gewissen, die Toxizität herabsetzenden Einfluß müssen allerdings das im Serum suspendierte Lecithin und Cholesterin haben, wie andere Versuche zeigen, doch spielen die Salze des Serums, besonders das $CaCl_2$, die Hauptrolle.

Versuch mit Kaulquappen in 1:100000 Kobragift in einem Gemisch von 25 ccm Pferdeblutserum + 15 ccm 0,2%igen $CaCl_2$.

Um 10^{10} p. m. des 30. IV. 4 Kaulquappen in obiges Gemisch gesetzt.

Um 10^{30} a. m. des 1. V. (also nach mehr als 12 Stunden) alle Kaulquappen gut beweglich.

Um 7^{05} p. m. des 1. V. eine Kaulquappe noch ziemlich gut beweglich, die drei anderen unbeweglich, aber noch mit sehr gut erhaltenem Körper.

Am nächsten Tage um 3^{50} p. m. alle tot.

Der letzte Versuch ist deswegen wichtig, weil er zeigt, **daß bei einem künstlich erhöhten $CaCl_2$-Gehalt des Blutplasmas** die Toxizität des Kobragifts **noch viel stärker** als von normalem Blutplasma herabgesetzt wird. Der schließliche Tod der Kaulquappen ist jedenfalls durch Serumbestandteile, nicht durch das Kobragift verursacht worden.

Verwendet man stärkere Lösungen von Kobragift in Blutserum, so kann man auch bei Anwendung von frischem unverdünntem und nicht vorher erwärmtem **Ochsenserum** aus dem zeitlichen Verlaufe der Vergiftungssymptome leicht nachweisen, daß die Toxizität von Kobragift mäßig stark durch das Serum herabgesetzt wird, ganz wie durch Pferdeblutserum, aber nicht stärker. In reinem unverdünntem Ochsenblutserum werden nämlich die Bewegungen von ca. 13 mm langen Kaulquappen nach 1 Stunde noch nicht stärker beeinträchtigt und erst nach ca. 4 Stunden aufgehoben; bei Zusatz von 1:10000 **Kobragift** werden sie erst in $^1/_2$ Stunde völlig unerregbar,

um bald darauf zu sterben, während in 1:10000 Kobragift in reinem Wasser gelöst Kaulquappen ihre Erregbarkeit in noch bedeutend kürzerer Zeit verlieren. In derselben Weise (Studium des zeitlichen Verlaufs) kann man auch für Kobragiftkonzentrationen zwischen 1:10000 und 1:100000 in 2 Teilen Ochsenblutserum + 1 Teil Wasser sowohl die Toxizität von Kobragift im Serum, wie die Tatsache, daß die Toxizität durch Serum bedeutend herabgesetzt wird, feststellen; doch ist diese Art des Experimentierens weniger zweckmäßig als die Verwendung von Pferdeblutserum oder vorher erhitztem Ochsenblutserum zu den Versuchen.

Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Kapitels.

Die Hauptergebnisse der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche sind die, daß die Gegenwart von Kalksalzen in der Lösung die Toxizität von Kobragiftlösungen außerordentlich stark herabsetzt, und zwar nicht allein für das Zentralnervensytem, sondern auch und in ungefähr gleichem Grade für die Hautepithelien und andere Gewebezellen. Bei Gegenwart von 0,5% $CaCl_2$ in der Lösung muß man die Kobragiftkonzentration mehr als hundertmal höher nehmen, um den gleichen Vergiftungsgrad wie in einer Kobragiftlösung ohne Kalksalze zu erhalten. Calcium bildet jedenfalls mit den wirksamen Bestandteilen des Kobragifts dissoziierbare, wahrscheinlich salzartige Verbindungen, welche die lebenden Haut- und Kiemenepithelien nicht zu durchdringen vermögen. Auch Blutplasma setzt, hauptsächlich infolge seines Gehalts an Kalksalzen, teilweise aber dank seines Kochsalzgehaltes, die Toxizität des Kobragifts etwa auf ein Viertel des ursprünglichen Wertes herab, doch haben Sera von Säugetieren selber eine spezifisch schädliche Wirkung auf Kaulquappen, und zwar Sera von verschiedenen Säugetieren in sehr verschiedenem Grade. Diese schädlichen Wirkungen der Sera auf Kaulquappen können durch kurzdauernde Erhitzung auf 56° C aufgehoben werden. Zusatz von $CaCl_2$ zu Serum, das Kobragift enthält, erniedrigt die Wirksamkeit der Kobragiftbestandteile im Serum, aber nicht die spezifisch schädlichen Wirkungen des Serums selber auf Kaulquappen.

Für die praktische Behandlung eines Kobrabisses ergibt sich, daß es vorteilhaft sein muß, nach sofortiger Anlegung einer Ligatur oberhalb der Bißstelle reichliche Mengen einer 1 bis 2%igen $CaCl_2$-Lösung an verschiedenen Stellen in der Nähe des Bisses zu injizieren und die Flüssigkeit sofort wieder ausfließen zu lassen, denn die $CaCl_2$-Lösung bemächtigt sich sofort des größten Teils des noch nicht resorbierten Kobragifts, mit dem sie in Berührung kommt, ohne die Gewebe zu schädigen. Da bei erhöhtem Gehalt an Kalksalzen das im Blutplasma befindliche Kobragift weniger wirksam wird, so kann eine Resorption von einem Teil des injizierten Calciumchlorids nur nützen. Subcutane Injektionen von $CaCl_2$-Lösungen an andern Stellen der Körpers, wo die Zirkulation nicht verhindert ist, dürften (zur Vermehrung des Kalkgehalts des Blutplasmas) ebenfalls von Vorteil sein, wie denn Einspritzung von $CaCl_2$-Lösungen in den Rückensack eines Frosches, selbst längere Zeit nach vorheriger Injektion nicht allzu großer Kobragiftdosen, die Vergiftungssymptome teilweise zurückgehen machen. Wegen schneller Ausscheidung des überschüssigen Kalks aus dem Blute und der starken „Affinität" gewisser Phasen der Neurone (und anderer Gewebszellen) zu dem Kobragift darf man sich aber nicht übertriebenen Erwartungen in bezug auf die günstigen Wirkungen des $CaCl_2$ gegenüber dem bereits resorbierten Gift hingeben. Wahrscheinlich ist Antivenin hier wirksamer. Vermutlich würden sich $CaCl_2$-Lösungen auch gegenüber Viperbiß und dem Biß anderer giftiger Schlangen wirksam erweisen. (Über die Wirkung gegen Bienengift vgl. Anhang.)

III. Kapitel.

Über die teilweise Entgiftung von Kobragiftlösungen durch Antivenin unter Anwendung von Kaulquappen als Indicatoren.

Bekanntlich ist es Calmette gelungen, Antivenine gegen Kobragift und das Gift von anderen Schlangen nach ähnlichen Prinzipien wie bei der Darstellung von Antidiphtherieserum zu erhalten.

Die folgenden Versuche sind sehr geeignet, um die Wirkung des Antikörper während der Vorlesung zu demonstrieren. Sie zeigen aber auch, wie Kaulquappen dazu benutzt werden können, den Wirkungsgrad eines Antiveninserums zu messen und die

quantitativen Verhältnisse bei der Reaktion von Venin und Antivenin auf anderer Weise als bisher geschehen, zu studieren. Leider gingen uns das Antivenin und Kaulquappen von geeigneten Entwicklungsstadien aus, ehe die letztgenannten Verhältnisse in wünschenswerter Ausdehnung erforscht werden konnten. Die Untersuchung derselben soll im nächsten Frühling fortgesetzt werden.

Im Handeln kommt Antivenin sowohl in flüssiger als in fester Form in zugeschmolzenen Glasröhren vor:

Zu Versuchszwecken ist die feste Form vorzuziehen, da dieselbe auch nach Öffnung der Röhren gut haltbar ist. Wir haben ausschließlich diese Form benutzt und das eingetrocknete Antiveninserum in 0,2 bis 0,3 %igen Lösungen von NaCl aufgelöst, was im Wasserbad bei 37° rasch erfolgt. Wir haben die Lösungen von Kobragift und von Antivenin miteinander gemischt, einige Zeit vor Einsetzen der Kaulquappen, und zwar wurden die gemischten Lösungen vor Beginn des eigentlichen Versuchs teils bei Zimmertemperatur, teils bei 37° gehalten, in letzterem Falle aber stets vor Einführung der Kaulquappen abgekühlt. Diese Verhältnisse sind bei den einzelnen Versuchen angegeben. Ob übrigens die Reaktion zwischen Venin und Antivenin wirklich eine meßbare Zeit erfordert, ist noch zu ermitteln. Das Nichtgelingen des ersten Versuchs, in dem Venin und Antiveninlösungen nur kurze Zeit vor Beginn des Versuchs in der Kälte gemischt wurden, führte zur angegebenen Maßregel; da aber beim ersten Versuche die Kobragiftlösung im Verhältnis zu der Antiveninlösung wirklich zu stark genommen war, beweist das Nichtgelingen desselben nichts. In allen Fällen ist die Reaktion bei Körpertemperatur eine recht rasche.

Vorversuche mit 0,1 bis 1 %igem Antivenin in 0,2 oder 0,3 %igen Kochsalzlösungen gelöst ohne Zusatz von Kobragift zeigten, daß diese Lösungen keine schädlichen Wirkungen auf Kaulquappen ausüben. Erst wenn dieselben nach einigen Tagen in Fäulnis geraten, können sie schädlich wirken.

Zunächst mögen drei parallele Versuche mitgeteilt werden, die bei einem Vortrage über die Wirkungsweise des Kobragiftes im hiesigen Ärzteverein (31. V. 1910) demonstriert wurden.[1])

Versuche mit Kaulquappen in 1:50000 und 1:100000 Kobragift ohne Zusatz von Antivenin und 1:50000 Kobragift mit Zusatz von $^1/_4$ %igem eingetrocknetem Antiveninserum.

Um 6^{55} p. m. des 31. V. wurden je zwei 17 bis 18 mm lange Kaulquappen von Rana fusca in:

---

[1]) Ein Autoreferat (schwedisch) über diesen Vortrag ist in der schwedischen Zeitschrift Hygiea erschienen.

A. 1:50000 Kobragift in 20 ccm dest. Wasser,

B. 1:100000 „ „ 20 „ „ „

und um 6^{57} p. m. zwei andere Kaulquappen in

C. 1:50000 Kobragift in $^1/_4$%igem Antiveninserum (sicc.), das in 0,2%igem NaCl gelöst war. Diese Lösung wurde 3 Stunden vorher durch Mischung gleicher Volumina 1:25000 Kobragift in destilliertem Wasser und $^1/_2$%iger Lösung des festen Antiveninserums hergestellt.

Beide Kaulquappen in A waren in weniger als einer halben Stunde völlig gelähmt, die beiden in B nach ca. 1 Stunde. Die Kaulquappen in C dagegen waren am Schlusse (ca. 8^{30} p. m.) ebenso lebhaft beweglich wie vor Anfang des Versuches. Um 8 p. m. waren die Hautepithelien der Kaulquappen in A schon makroskopisch deutlich angegriffen, um 8^{30} p. m. zum Teil abgelöst.

Nach dem Vortrage wurde der Versuch noch fortgesetzt:

Um 11^{35} p. m. d. 31. V. beide Kaulquappen in C gut beweglich, höchstens etwas träger als normal. Ebenso um 11^{40} a. m. des 1. VI.; ebenso um 2^{00} p. m. des 2. VI. Noch am Abend des 4. VI. war eine Kaulquappe noch gesund, obgleich bereits Fäulnisgeruch der Lösung eingetreten war. (Temp. während dieser Versuche 17 bis 18° C.)

Versuch mit Kaulquappen in 1:25000 Kobragift in 1%igem Antiveninserum.

Kobragift und Antivenin 4 Stunden vor Beginn des Versuchs miteinander gemischt und bei Zimmertemperatur gelassen. Temperatur während des Versuchs 18 bis $20^1/_2$° C.

Um 8^{00} p. m. des 2. VI. 2 Kaulquappen in dieses Gemisch gesetzt.

Um 11^{30} p. m. des 2. VI. beide Kaulquappen völlig gesund und lebhaft beweglich.

Um 11^{35} a. m. des 3. VI. beide Kaulquappen noch lebhaft beweglich und gesund.

Um 6^{00} p. m. des 3. VI. beide Kaulquappen noch ziemlich gut beweglich.

Um 8^{20} p. m. des 3. VI. eine Kaulquappe noch beweglich, die andere bewegungslos.

Um 11^{58} p. m. des 3. VI. ebenso.

Am folgenden Morgen beide Kaulquappen tot.

Dieser Versuch war, wegen Mangels genügender Mengen Antivenin, der einzige, der mit 1%igen Lösungen von Antivenin ausgeführt wurde, und es ist daher möglich, daß der etwas frühzeitige Tod der Kaulquappen mehr auf Zufälligkeiten beruht, als daß 1%ige Antiveninlösungen nicht völlig ausreichend sind, Kaulquappen vor so starken Lösungen von Kobragift wie 1:25000 völlig zu schützen.

Versuche mit Kaulquappen in Lösungen von Kobragift + Antivenin.

Nach Mischung der Kobragift- und der Antiveninserumlösungen wurden die gemischten Lösungen während $2^1/_2$ Stunden im Thermostaten

bei 37° gelassen (diese Zeit ist sicher unnötig lang) und nachher abgekühlt. Die angegebenen Gehalte an Kobragift und Antivenin beziehen sich auf das fertige Gemisch.

Bei jedem Versuche wurden je 20 ccm des Gemisches verwendet. Temperatur während der Versuche 13 bis 14° C.

Um 6^{30} p. m. des 5. V. 1910 wurden:

A. 4 Kq. in eine Lösung von 1:50000 Kobragift + 1:250 Antivenins. (sicc.)
B. 6 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:1000 „ „
C. 4 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:2000 „ „
D. 5 Kq. „ „ „ „ 1:100000 „ + 1:4000 „ „
gesetzt.

Um 7^{15} p. m. des 5. V. (also nach 55 Minuten) waren alle Kaulquappen in A, B und C noch gesund und lebhaft beweglich, in D dagegen alle mehr oder weniger stark affiziert (die Wirkung war hier schon um 6^{55} p. m. leicht erkennbar), zwei derselben waren noch ziemlich gut beweglich, zwei nur noch schlecht beweglich und eine bereits unbeweglich.

Um 7^{40} p. m. des 5. V. Verhalten aller Kaulquappen in A, B und C unverändert, Lähmung der Kaulquappen in D etwas weiter geschritten, aber noch nicht bei allen vollständig.

Um 9^{00} a. m. des 6. V. (fast 15 Stunden nach Beginn des Versuchs) alle Kaulquappen in A, B und C lebhaft beweglich, alle Kaulquappen in D dagegen völlig unerregbar, aber sonst sehr gut aussehend.

Um 7^{15} p. m. des 6. V. alle Kaulquappen in A, B und C lebhaft beweglich; in D alle unerregbar, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation.

Um 11^{15} a. m. des 7. V. Kaulquappen in A, B und C gut beweglich; in D alle tot.

Die Kaulquappen in A, B und C blieben noch während mehrerer Tage gesund.

Versuch mit Kaulquappen in 1:50000 Kobragift + 1:1000 Antiveninserum.

Um 6^{27} p. m. des 7. V. drei Kaulquappen in eine Lösung, die 1:50000 Kobragift und 1:1000 Antiveninserum (sicc.) enthielt. Die Mischung von Kobragift und Antivenin erfolgte 3 Stunden vorher und wurde bei 14° C. gelassen.

Um 11^{17} p. m. des 7. V. alle Kaulquappen noch beweglich, aber träge.

Um 12^{45} p. m. des 8. V. alle Kaulquappen unerregbar. Zirkulation aber noch gut erhalten. Protokoll nicht weiter geführt.

Antivenin 1:1000 ist also nicht genügend stark, um das Nervensystem vor der völligen Lähmung durch 1:50000 Kobragift zu schützen, setzt aber sonst die Wirkung des Kobragifts sehr stark herab.

Aus diesen und anderen Versuchen können die angenäherten Werte der Konzentrationen von Antiveninserum (sicc.) abgeleitet werden, die gerade ausreichen, Kobragiftlösungen von bekannter Konzentration so weit zu „neutralisieren“, daß sie für

das Nervensystem der Kaulquappen unschädlich werden, aber nur über einen kleinen Konzentrationsbereich. So genügt

1:4000 nicht, wohl aber 1:2000 Antivenin, um 1:100000 Kobragift zu neutralisieren;

1:400, vielleicht etwas weniger Antivenin ist ausreichend, um 1:50000 Kobragift unschädlich zu machen. 1:1000 Antivenin genügt hierzu nicht.

1:100 Antivenin, vielleicht weniger, genügt, um 1:25000 Kobragift unschädlich zu machen.

Es wäre leicht, durch Ausführung einer größeren Anzahl Versuche mit Kaulquappen in ihren, zu solchen Versuchen günstigsten Entwicklungsstadien, die Werte noch viel genauer zu bestimmen und über einen viel größeren Konzentrationsbereich zu ermitteln, was womöglich im nächsten Frühling geschehen soll.

Während der wirksame Bestandteil des Kobragifts so außerordentlich leicht durch die unbeschädigten Haut- und Kiemenepithelien (und sicher auch in alle anderen Zellen) der Kaulquappen eindringt, dringt das Antivenin überhaupt nicht ein, wie der folgende Versuch beweist.

Versuch, um das Nichteindringen von Antivenin in Kaulquappen zu beweisen.

Um 6^{31} p. m. des 4. VI. zwei Kaulquappen von Rana fusca (ca. 18 mm lang), die seit 3^{30} p. m. des 2. VI. (also ca. 51 Stunden) in $1\,^0/_0$igem Antiveninserum verweilt hatten und recht gesund und lebhaft waren, nach Abspülen in reinem Wasser während 5 bis 10 Sekunden in 1:100000 Kobragift (in dest. Wasser gelöst) übergeführt, und gleichzeitig zwei andere (etwas kleinere) Kaulquappen, die nicht mit Antivenin vorbehandelt waren, in dieselbe Menge 1:100000 Kobragift gesetzt. Temp. $20^1/_2{}^0$ C.

Um 7^{05} p. m. Kaulquappen in beiden Gefäßen fast gelähmt, aber periodenweise kurzdauernde, ungeschickte Bewegungen ausführend.

Um 7^{15} p. m. die zwei etwas größeren Kaulquappen aus dem Antiveninserum fast, aber noch nicht ganz unerregbar, die zwei anderen unerregbar.

Um 7^{25} p. m. des 4. VI. alle Kaulquappen in beiden Gefäßen völlig unerregbar.

Um 11^{56} p. m. des 4. VI. alle Kaulquappen in beiden Gefäßen in histologischer Desintegration begriffen.

Die unbedeutend später eintretende vollständige Lähmung bei den Kaulquappen aus der Antiveninlösung ist jedenfalls rein zufällig.

Kaulquappen von derselben Größe werden häufig erst nach ca. 1 Stunde (vgl. Kap. I) in 1:100000 Kobragift völlig gelähmt. Im übrigen wird wahrscheinlich noch etwas Antivenin an der Außenfläche der Hautepithelien adsorbiert gewesen sein. Bei einer merklichen Aufnahme von Antivenin in die Körper der Kaulquappen müßte die Lähmung, wenn überhaupt, erst nach vielen Stunden oder Tagen eintreten.

Man kann diesen Versuch noch ergänzen dadurch, daß man Kaulquappen zuerst in 1:600000 oder weniger Kobragift völlig lähmt und, nachdem die Lähmung einige Zeit bestanden hat, einen Teil der Kaulquappen in reines Wasser, einen Teil derselben in eine Lösung von Antivenin überführt. Wenn man für die nötige Bewegung der Flüssigkeiten sorgt, tritt eine Erholung der Kaulquappen in beiden Fällen ungefähr gleich langsam ein, bei Mangel an Bewegung können die Kaulquappen in der Antiveninlösung sich etwas rascher erholen (im übrigen nicht beobachtet).

Es darf mit einer an Gewißheit grenzenden Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß, auch bei Einspritzung von Antiveninserum in ein mit Kobragift vorbehandeltes Tier, das Antivenin nicht den wirksamen Teilen des Kobragifts bis in die Neurone hinein nachjagt, daß es vielmehr bloß einen großen Teil der noch im Blutplasma und in der Gewebelymphe befindlichen Giftmoleküle bindet. Dadurch verhindert es eine weitere Aufnahme des Gifts, resp. bei bereits eingetretenem Gleichgewicht der Konzentration der Giftmoleküle in den Neuronen und in der diese umspülenden Lymphe, dieses Gleichgewicht durch Verringerung der Giftkonzentration in dieser perineuronalen Lymphe stört und dadurch einen Austritt von einigen Giftmolekülen aus den Neuronen veranlaßt. Diese wieder werden teilweise gebunden. So wird die Entgiftung herbeigeführt, wenn die Vergiftung nicht schon zu weit fortgeschritten war.

IV. Kapitel.

Über die Speicherung von Kobragift durch die roten Blutkörperchen und über die Größe dieser Speicherung unter verschiedenen Bedingungen.

Es ist schon aus früheren Untersuchungen bekannt, daß Kobragift außer seiner lähmenden Wirkung auf das Zentral-

nervensystem auch eine sogenannte lytische Wirkung auf verschiedene Zellen ausübt, eine Wirkung, die auch in dieser Abhandlung bezüglich der Hautepithelien der Kaulquappen wiederholt zur Sprache gekommen ist. Diese Wirkung tritt, wie wir gesehen haben, stets erst bei viel höheren Konzentrationen des Giftes ein als die, die zur Lähmung des Zentralnervensystems ausreicht. Bisher ist diese Eigenschaft des Kobragiftes besonders bei den roten Blutkörperchen studiert worden. Die meisten Verfasser, namentlich die aus der Ehrlichschen Schule, glaubten auch im Sekret der Giftdrüsen mindestens zwei verschiedene giftige Verbindungen unterscheiden zu müssen, die sie als Hämolysin und Neurotoxin bezeichnet haben. Einige Verfasser haben sogar die Existenz einer ganzen Reihe giftiger Substanzen im Sekret postuliert, von der jede auf eine besondere Zellart schädlich einwirken sollte. Letztere Annahme ist in allen Fällen völlig unbegründet, und es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß das Neurotoxin und Hämolysin identisch sind.

In allen Fällen beweisen die folgenden Versuche mit aller Schärfe, daß das sog. Neurotoxin von den roten Blutkörperchen in großen Mengen „gespeichert" wird und daß bei gleicher Konzentration des Neurotoxins in der umgebenden Lösung die größte Speicherung unter denselben Bedingungen erfolgt, unter den die Hämolyse am leichtesten eintritt, wobei namentlich der Einfluß der verschiedenen Salze von großer Bedeutung ist.

Um die Menge des von einem gegebenen Volumen Blutkörperchenbrei unter bekannten Bedingungen aufgenommenen Neurotoxins zu bestimmen, benutzten wir Kaulquappen als quantitative Indicatoren unter Benutzung der Daten, die im ersten Kapitel festgestellt worden sind. Daselbst fanden wir, daß bei Verwendung von ca. 40 ccm Flüssigkeit eine Konzentration von 1:1000000 Kobragift gerade ausreicht, um Kaulquappen innerhalb ca. 24 Stunden vollständig zu lähmen, und daß die Lähmung um so rascher eintritt, je mehr die Konzentration diesen Grenzwert überschreitet. Wir haben gesehen, daß die Gegenwart von 6 bis $6^1/_2$ % Rohrzucker in den Kobragiftlösungen ohne Einfluß auf den Vergiftungsverlauf ist, und daß die Gegenwart von 0,6 bis 0,65 % NaCl zwar den Grenzwert etwas, aber doch nur um ca. 50 % erhöht.

Aus den folgenden Versuchen, deren Anordnung aus den Protokollen ersichtlich ist, ergiebt sich das zunächst sehr überraschende Faktum, daß Blutkörperchen weit mehr „Neurotoxin“ aus einer Lösung von Kobragift in Rohrzuckerlösung als aus einer gleich konzentrierten Giftlösung in isotonischer Kochsalzlösung aufnehmen. Die Differenzen sind außerordentlich groß, so daß von Versuchsfehlern keine Rede sein kann, um so weniger, als jeder von uns unter Anwendung etwas verschiedener Methoden zu gleichen Ergebnissen gekommen ist.

Die zwei zunächst mitzuteilenden Versuche wurden mit zwei Portionen derselben Blutprobe ausgeführt.

Versuch über die Speicherung von „Neurotoxin“ durch die roten Blutkörperchen eines Kalbes. Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung suspendiert. 18. Mai 1910.

Zirka 15 ccm Blutkörperchenbrei von zentrifugiertem Kalbsblut wurden mit 200 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung gemischt und diese Suspension aufs neue zentrifugiert.

Von dem erhaltenen Brei wurden 4 ccm mit 50 ccm der Lösung von folgender Zusammensetzung gemischt: 1 ccm einer frisch bereiteten Stammlösung von Kobragift (1:1000) + 49 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung (L). Die Mischung wurde von Zeit zu Zeit gut geschüttelt und nach $^3/_4$ Stunden zentrifugiert. Während dieser Zeit nahmen die Blutkörperchen den größten Teil des Kobragiftes aus der Lösung in sich auf, wie der folgende Teil des Versuchs lehrt. Eine Hämolyse fand dabei nicht statt.

20 ccm der resultierenden farblosen Zentrifugenflüssigkeit wurden abpipettiert und mit 20 ccm Wasser verdünnt (Lösung L′).

Um 11^{02} a. m. des 18. V. wurden 4 Kaulquappen von Rana fusca (ca. 16 mm lang) in diese Lösung (L′) eingeführt.

Um 1^{00} p. m., um 4^{45} p. m. und um 11^{30} p. m. des 18. V. alle Kaulquappen noch normal beweglich.

Um 1^{00} p. m. und um 8^{10} p. m. des 19. V. alle Kaulquappen noch normal beweglich. Ebenso während der nächsten Tage. Temperatur während des ganzen Versuchs 17 bis 18° C.

Wenn die 4 ccm Blutkörperchenbrei kein Neurotoxin aus der ursprünglichen Lösung von Kobragift in 8%igem Rohrzucker (L) aufgenommen hätten, so müßte die Lösung L′, in der sich die Kaulquappen befanden, Neurotoxin in der gleichen Konzentration wie eine Kobragiftlösung von 1:100000 enthalten haben, während in Wirklichkeit die Kaulquappen sich so verhielten wie in einer Lösung, die weniger als 1:1000000 Kobragift enthält. Die Blutkörperchen müssen also so viel Neurotoxin aus der 8%igen Rohrzuckerlösung L aufgenommen haben, daß sie (die Blutkörperchen) nach eingetretenem Gleichgewichtszustande

nervensystem auch eine sogenannte lytische Wirkung auf verschiedene Zellen ausübt, eine Wirkung, die auch in dieser Abhandlung bezüglich der Hautepithelien der Kaulquappen wiederholt zur Sprache gekommen ist. Diese Wirkung tritt, wie wir gesehen haben, stets erst bei viel höheren Konzentrationen des Giftes ein als die, die zur Lähmung des Zentralnervensystems ausreicht. Bisher ist diese Eigenschaft des Kobragiftes besonders bei den roten Blutkörperchen studiert worden. Die meisten Verfasser, namentlich die aus der Ehrlichschen Schule, glaubten auch im Sekret der Giftdrüsen mindestens zwei verschiedene giftige Verbindungen unterscheiden zu müssen, die sie als Hämolysin und Neurotoxin bezeichnet haben. Einige Verfasser haben sogar die Existenz einer ganzen Reihe giftiger Substanzen im Sekret postuliert, von der jede auf eine besondere Zellart schädlich einwirken sollte. Letztere Annahme ist in allen Fällen völlig unbegründet, und es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß das Neurotoxin und Hämolysin identisch sind.

In allen Fällen beweisen die folgenden Versuche mit aller Schärfe, daß das sog. Neurotoxin von den roten Blutkörperchen in großen Mengen „gespeichert" wird und daß bei gleicher Konzentration des Neurotoxins in der umgebenden Lösung die größte Speicherung unter denselben Bedingungen erfolgt, unter den die Hämolyse am leichtesten eintritt, wobei namentlich der Einfluß der verschiedenen Salze von großer Bedeutung ist.

Um die Menge des von einem gegebenen Volumen Blutkörperchenbrei unter bekannten Bedingungen aufgenommenen Neurotoxins zu bestimmen, benutzten wir Kaulquappen als quantitative Indicatoren unter Benutzung der Daten, die im ersten Kapitel festgestellt worden sind. Daselbst fanden wir, daß bei Verwendung von ca. 40 ccm Flüssigkeit eine Konzentration von 1:1000000 Kobragift gerade ausreich[illegible] um Kaulquappen innerhalb ca. 24 Stunden vollständig zu lähm[illegible] und daß die Lähmung um so rascher eintritt, je mehr [illegible] Konzentration diesen Grenzwert [illegible]berschreitet. Wir [illegible] gesehen, daß die Gegenwart [illegible] bis 6[illegible] in den Kobragiftlösungen ohne [illegible]ß au[illegible] verlauf ist, und daß die Gegenwa[illegible] 0,6 [illegible] den Grenzwert etwas, aber doc[illegible] um[illegible]

Um 11^{25} p. m. des 18. V. alle Kaulquappen noch beweglich, aber etwas träge.

Um 1^{05} p. m. des 19. V. alle noch etwas beweglich.

Um 8^{20} p. m. des 19. V. drei noch beweglich, aber sehr träge, die vierte unbeweglich. Alle mit gut erhaltener Zirkulation.

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß, wenn Blutkörperchen in einer 0,8 %igen Kochsalzlösung, die etwas Kobragift enthält, suspendiert werden, sie so viel Neurotoxin aus der Lösung aufnehmen, daß sie nach eingetretenem Gleichgewicht das Neurotoxin in einer ca. 6 mal höheren Konzentration enthalten als die sie umgebenden Lösungen. Dies gilt speziell für den Fall, daß die umgebende Lösung nach eingetretenem Gleichgewicht ungefähr so viel Neurotoxin enthält wie eine Lösung von 1:800000 Kobragift. Dabei ist berücksichtigt worden, daß Kaulquappen zur vollständigen Lähmung in Kochsalzlösung eine etwas höhere Kobragiftkonzentration erfordern als in einer Lösung ohne Salz.

In allen Fällen nehmen Blutkörperchen mehr als 10 mal so viel Neurotoxin aus einer Lösung von Kobragift in 8 %iger Rohrzucker- als aus einer gleich konzentrierten Kobragiftlösung in einer mit der Zuckerlösung isotonischen Kochsalzlösung.

Von den zahlreichen anderen Versuchen, die in ähnlicher Weise angestellt wurden, soll nur der folgende im Auszug mitgeteilt werden.

Je 0,2 ccm Blutkörperchenbrei vom Kalbsblute, das wie vorhin mit 8 %iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen worden war, wurden mit folgenden zwei Lösungen gemischt:

A. 50 ccm 1:100000 Kobragift in 8 %igem Rohrzucker gelöst.

B. 50 ccm 1:200000 „ „ 8 %igem „ „

Nach ³/₄ Stunden wurden die Lösungen A und B zentrifugiert.

Darauf wurden 20 ccm der abzentrifugierten Flüssigkeit von A mit 20 ccm dest. Wasser und 40 ccm 4 %igem Rohrzucker verdünnt und zwei Kaulquappen um 11^{45} p. m. am 21. V. in diese Lösung gesetzt.

Um 8^{45} a. m. des 22. V. waren beide Kaulquappen noch etwas beweglich, aber sehr träge; um 10^{25} p. m. des 22. V. völlig unbeweglich und ohne Zirkulation.

Von der abzentrifugierten Lösung B wurden einmal wie bei A 20 ccm mit 20 ccm dest. Wasser + 40 ccm 4 %iger Rohrzuckerlösung verdünnt; die resultierende Lösung bezeichnen wir mit B″. Außerdem wurden 20 ccm von B nur mit 20 ccm dest. Wasser verdünnt. Diese Lösung soll mit B′ bezeichnet werden.

Um 11^{45} p. m. des 21. V. wurden je 2 Kaulquappen in die Lösungen B′ und B″ gesetzt.

In B′ waren die Kaulquappen noch nach 9 Stunden beweglich, aber träge, nach 23 Stunden völlig gelähmt, aber mit vorzüglich erhaltener Zirkulation. Die Konzentration des Neurotoxins in dieser Lösung B′ müßte etwas höher sein, als 1:1000000 Kobragift in 4 %iger Rohrzuckerlösung

entsprechen würde. In der Lösung B'', die gerade halb soviel Gift wie die Lösung B' enthielt, blieben die Kaulquappen tagelang normal beweglich. Die Konzentration des Neurotoxins in dieser Lösung müßte also geringer gewesen sein, als einer Kobragiftlösung von 1:1000000 entspräche.

Die Verteilung des Neurotoxins zwischen gleichen Volumina Blutkörperchen und 8%iger Rohrzuckerlösung würde sich aus dem Versuche zu ca. 200:1 ergeben.

Der folgende Versuch wurde nach einer nur wenig modifizierten Methode ausgeführt.

Versuch: 50 ccm Kalbsblut wurden mit 150 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung versetzt und darauf scharf zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde darauf abgegossen und die Blutkörperchen mit 8%iger Rohrzuckerlösung bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt. Von dieser Blutaufschwemmung wurden 4 Proben à 2 ccm abpipettiert und jede Probe mit 38 ccm 6,5%iger Rohrzuckerlösung verdünnt. Zu den so erhaltenen Blutkörperchensuspensionen wurde in absteigender Menge so viel einer 0,1%igen Kobragiftlösung zugesetzt, daß die Suspensionen folgende Giftquantitäten enthielten:

a) 1:25000, b) 1:50000, c) 1:100000 und d) 1:200000.

Nach 1 Stunde wurde scharf zentrifugiert, wonach man 38 bis 39 ccm fast farblose Zuckerlösung von jeder Probe abpipettieren konnte.

Um 6^{45} p. m. des 18. IV. 1910 wurde in jede dieser abpipettierten Proben je eine Kaulquappe eingesetzt.

Um 8^{50} p. m. die Kaulquappen in a) unbeweglich, die Kaulquappen in den drei andern Lösungen noch beweglich. Zirkulation bei der Kaulquappe in a) noch erhalten, ebenso um 11^{00} p. m. aber schon träge.

Um 10^{00} a. m. des 19. IV. Kaulquappen in a) und b) unbeweglich, in c) und d) dagegen noch gut beweglich, ebenso nachmittag.

Am 20. IV. die Kaulquappe in c) unbeweglich, aber mit erhaltener Zirkulation, die Kaulquappe in d) noch lebhaft beweglich.

Auch aus diesem Versuche würde sich eine Teilung des Neurotoxins zwischen Blutkörperchen und Lösung in einem Verhältnis von mehr als 200:1 zugunsten der Blutkörperchen ergeben.

Wenn man die abzentrifugierten Blutkörperchen in der Probe a) mit ca. 40 ccm reiner, 6,5%iger Zuckerlösung versetzt, so geben dieselben so viel Neurotoxin wieder ab, daß Kaulquappen durch die Lösung völlig gelähmt werden. Das Neurotoxin ist also von den Blutkörperchen nicht zersetzt worden, und die Aufnahme desselben durch die Blutkörperchen muß auf einem reversiblen Prozeß beruhen.

Wir haben schon gesehen, daß, wenn Blutkörperchen in einer Kochsalzlösung suspendiert werden, die Kobragift in einer bestimmten Konzentration enthält, sie viel weniger Gift aufnehmen, als wenn sie in einer isotonischen Rohrzuckerlösung,

die Kobragift in derselben Konzentration enthält, suspendiert werden. Dem entspricht die Erfahrung, daß, wenn man gleiche Volumina Blutkörperchen, die sich vorher in derselben mit Kobragift versetzten 8%igen Rohrzuckerlösung mit Gift beladen haben, einerseits mit einer 8%igen Rohrzuckerlösung, andererseits mit einer gleichen Menge isotonischer Kochsalzlösung behandelt, sie vielmehr Gift an die Kochsalzlösung als an die Zuckerlösung abgeben, was wieder durch Anwendung von Kaulquappen als quantitative Indicatoren gezeigt werden kann.

Daß Kaulquappen nur eine wenig höhere Konzentration von Kobragift erfordern, um völlig gelähmt zu werden, wenn sich das Kobragift in einer Kochsalzlösung anstatt in einer isotonischen Rohrzuckerlösung oder in reinem Wasser gelöst findet, während Blutkörperchen aus einer mit Kobragift versetzten Kochsalzlösung viel weniger Neurotoxin aufnehmen als aus gleich konzentriertem Kobragift in Zuckerlösung, ist an und für sich eine merkwürdige Tatsache, spricht aber keineswegs gegen die Identität von Neurotoxin und Hämolysin in Kobragift, da Bang[1]) schon früher gezeigt hat, daß das Kobragifthämolysin von Blutkörperchen, die in Zuckerlösungen suspendiert sind, viel reichlicher aufgenommen wird als durch solche, die in Lösungen von Natriumchlorid oder andern Salzen aufgeschwemmt sind. In derselben Arbeit hat Bang versucht, eine Erklärung dieser Tatsache zu geben.

Wenn Blutkörperchen sich in einer mit Kobragift versetzten Rohrzuckerlösung mit Gift beladen haben, so geben sie einen bedeutend größeren Teil des Giftes wieder ab, wenn sie durch Wasser hämolysiert werden, als wenn sie mit einem gleichen Volumen Zuckerlösung versetzt werden. Dies macht es wahrscheinlich, daß das Kobragift in den Blutkörperchen nicht bloß von den Lipoiden der Blutkörperchen gespeichert werden, sondern auch von in Wasser löslichen Bestandteilen der Blutkörperchen, z. B. deren Alkalisalzen gebunden werden, wie dies von Bang schon früher vermutet worden ist. Da Blutkörperchen viel weniger Kobragift aus Kochsalzlösungen als aus Rohrzuckerlösungen bei gleichem Kobragiftgehalt der beiden Lösungen aufnehmen, so können die ersteren bei der Hämolyse durch viel Wasser natürlich auch nur weniger Gift wieder abgeben.

[1]) Bang, diese Zeitschr. 18, 441, 1909.

Der folgende Versuch gibt einen Überblick über diese Verhältnisse.

Versuch: Kalbsblut wurde mit 0,8%iger Kochsalzlösung resp. mit 8%iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen, zentrifugiert und die Blutkörperchen bzw. mit Kochsalz und Rohrzucker von den genannten Konzentrationen bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt.

2 ccm der beiden Aufschwemmungen wurden bzw. mit 40 ccm Zuckerlösung und mit 40 ccm NaCl-Lösung gemischt und zu den beiden Suspensionen so viel Kobragift zugesetzt, als einer mittleren Konzentration von 1:50000 entpricht.

Nach $1^1/_2$ Stunden wurden die beiden Proben zentrifugiert und darauf sowohl die Blutkörperchen der Zuckerlösung wie die der Kochsalzlösung durch je 40 ccm Wasser hämolysiert. Wir bezeichnen die erste hämolysierte Lösung mit A, die zweite mit B.

Um 1^{30} p. m. des 21. V. 1910 wurde je eine Kaulquappe in die Lösungen A und B eingesetzt.

Um 5^{30} p. m. des 21. V. die Kaulquappe in A bereits tot, die in B noch etwas beweglich; später starb auch diese.

Um 5^{32} p. m. des 21. V. wurden 20 ccm von A mit 20 ccm Wasser (= Lösung A_1) und 10 ccm A mit 30 ccm Wasser (= Lösung A_2) verdünnt. In die Lösungen A_1 und A_2 wurde je eine Kaulquappe gesetzt.

Um 6^{10} p. m. des 21. V. wurden auch 20 ccm der Lösung B mit der gleichen Menge Wasser verdünnt (= Lösung B_1) und eine Kaulquappe eingesetzt. Diese letzte Kaulquappe (in B_1) blieb tagelang beweglich.

Um 6^{10} p. m. des 21. V. die Kaulquappen in A_1 und A_2 noch gut beweglich, aber beide am folgenden Morgen schon tot.

Um 9^{45} a. m. des 22. V. wurden 5 ccm der Lösung A mit 35 ccm Wasser (= Lösung A_3) und $2^1/_2$ ccm der Lösung A mit $37^1/_2$ ccm Wasser verdünnt (= Lösung A_4) und in diese beiden Lösungen je eine Kaulquappe gesetzt. Die Kaulquappe in A_4 überlebte, die in A_3 starb innnerhalb 24 Stdn.

Dieser Versuch wurde noch dadurch ergänzt, daß je 20 ccm der Rohrzuckerlösung, aus der die Blutkörperchen einen großen Teil des Giftes aufgenommen hatten, nach dem Zentrifugieren abpipettiert wurden und mit 20 ccm Wasser verdünnt (= Lösung C) und ebenso 20 ccm der Kochsalzlösung, aus der die Blutkörperchen Gift aufgenommen hatten, mit 20 ccm Wasser versetzt (= Lösung D).

Um 1^{30} p. m. des 21. V. 1901 wurden je zwei Kaulquappen in diese Lösungen C und D gesetzt.

Die Kaulquappen in C überlebten mehrere Tage, die in D waren schon nach 5 Stunden beide tot.

In Kapitel II wurde gezeigt, daß Anwesenheit von Magnesiumchlorid in einer Kobragiftlösung, in der sich Kaul-

quappen befinden, nur einen geringen Einfluß auf den Verlauf der Vergiftung hat. Es wird dadurch nur wie bei Anwesenheit von NaCl in der Lösung die Minimalkonzentration des Kobragiftes, die zur vollständigen Narkose der Kaulquappen erforderlich ist, etwas erhöht. Bang hatte aber früher gefunden, daß Blutkörperchen aus einer mit Kobragift versetzten Magnesiumchloridlösung viel weniger Kobra-Hämolysin aufnehmen als aus einer isotonischen mit Kobragift versetzten Rohrzuckerlösung. Es müßte darum von Interesse sein, die Aufnahme von Neurotoxin aus magnesiumchloridhaltigen Lösungen durch Blutkörperchen zu untersuchen. Der folgende Versuch gibt Aufschluß hierüber.

Versuch: 50 ccm Kalbsblut wurden mit 8%iger Rohrzuckerlösung ausgewaschen, zentrifugiert und die Blutkörperchen mit einer frischen Zuckerlösung bis zum ursprünglichen Blutvolumen versetzt. Von dieser Blutkörperchen-Suspension wurden 2 Proben zu je 2 ccm genommen und jede Probe mit 38 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung versetzt. Zu der einen Probe, die als B bezeichnet sei, kamen außerdem 0,5% einer 4%igen kryst. Magnesiumchloridlösung ($MgCl_2 + 6\,Aq$). Der Gehalt dieser Lösung B an Magnesiumchlorid ($MgCl_2 + 6\,Aq$) betrug also 0,5‰.

Die andere Probe, die wir mit A bezeichnen, enthielt kein Salz.

Zu den Blutkörperchensuspensionen A und B wurde so viel einer 1‰igen Kobragiftlösung zugesetzt, daß die mittlere Konzentration des Kobragiftes in beiden 1:50000 betrug.

Nach $^1/_2$ Stunde Stehen bei 19° C wurden A und B zentrifugiert, worauf je 20 ccm des Abgusses von A und B mit 20 ccm Wasser verdünnt wurden. Die so verdünnten Lösungen bezeichnen wir mit A_1 und B_1.

Um 8^{15} p. m. des 17. V. wurde je eine Kaulquappe in jede dieser Lösungen A_1 und B_1 gesetzt.

Die Kaulquappe in A_1 blieb über 2 Tage beweglich. Am Morgen des 18. war die Kaulquappe in B_1 bereits tot.

Um 9^{30} a. m. des 18. wurden 10 ccm des Abgusses von B mit 30 ccm Wasser verdünnt (Lösung B_2) und eine Kaulquappe in diese Lösung B_2 gesetzt.

Um 5^{30} p. m. des 18. war die Kaulquappe in B_2 sehr träge und am nächsten Morgen tot.

Daß Zusatz von mäßigen Mengen Calciumchlorid (0,1 bis 0,2%) zu Kobragiftlösungen die Giftigkeit dieser Lösungen außerordentlich stark herabsetzt, sowohl bezüglich deren Einwirken auf das Zentralnervensystem wie auf die Hautepithelien usw., haben wir im zweiten Kapitel gezeigt. Bang fand dasselbe für die hämolytische Wirkung des Kobragiftes.

Alle diese Ergebnisse sprechen sehr zugunsten der Annahme, daß das Hämolysin des Kobragiftes sich nicht von

dem Neurotoxin unterscheidet, wenn auch zugegeben werden muß, daß der strenge Beweis dafür in quantitativer Hinsicht noch nicht erbracht ist.

Es wurden zum Schlusse einige Versuche ausgeführt, um einen etwaigen Einfluß von Suspensionen von Lecithin, Cholesterin und Olivenöl in den Lösungen, in denen Kaulquappen sich befanden, auf den Verlauf der Kobragiftintoxikation zu untersuchen. Die Versuche hatten zwar ein positives Ergebnis, indem alle drei Stoffe die Giftwirkung abschwächen, doch ist diese Wirkung keineswegs stark, am stärksten noch für Olivenöl. Es muß indessen bemerkt werden, daß schon recht geringe Zusätze Lecithin in Form der gewöhnlichen Handelsprodukte an und für sich schädlich auf Kaulquappen wirken, und zwar verschiedene Handelsprodukte in ungleichem Grade. So bewirkte ein Zusatz von 1:2000 sog. Agfa-Lecithin (der Zusatz geschah in Form einer Lösung von Lecithin in Methylalkohol zum Wasser, wobei die Menge Methylalkohol weit unter dem schädlichen Werte blieb) schon nach ca. 5 Stunden den Tod. Zusätze von 1:4000 und 1:8000 wurden bedeutend länger ertragen, führten aber auch innerhalb 36 bis 48 Stunden zum Tode der Kaulquappen. Beim Studium des Einflusses von Lecithin auf die Wirkung von Kobragift müssen also entweder äußerst geringe Lecithinmengen genommen werden oder es muß die Schnelligkeit, mit der die Lähmung eintritt, als Maßstab der Wirkung dienen. Es seien nun einige wenige Versuche über die abschwächende Wirkung der drei genannten Stoffe hier mitgeteilt.

Versuch mit Lecithin.

Um 6^{47} p. m. des 24. IV. 1910 wurden je 2 Kaulquappen in folgende drei Lösungen gesetzt:

a) 40 ccm einer Lösung, die 1:8000 Lecithin (Mercks Präparat) und 1:50000 Kobragift enthielt.

b) 40 ccm 1:8000 Lecithin + 1:100000 Kobragift.

c) 40 ccm 1:8000 Lecithin + 1:200000 Kobragift.

Um 8^{00} p. m. Kaulquappen in a), b) und c) alle noch beweglich; die in a) wären es sicher nicht mehr gewesen nach dieser Zeit ohne Zusatz von Lecithin, die in b) wahrscheinlich nicht mehr.

Um 11^{15} p. m. des 24. Kaulquappen in a) tot, Epithelien angegriffen, die Kaulquappen in b) waren noch beweglich, aber träge und selbst die Kaulquappen in c) weniger beweglich als normal. Das Verhalten der Kaulquappen war ungefähr dasselbe wie in Lösungen von

1:300000 und 1:500000 Kobragift ohne Zusatz von Lecithin nach gleicher Versuchsdauer. Am nächsten Morgen waren indessen auch die Kaulquappen in b) und c) bereits tot.

Sehr ähnlich verliefen die übrigen Versuche über den Einfluß von Lecithinzusatz zu den Lösungen. Immer war der Einfluß deutlich abschwächend, besonders in den ersten Stunden, aber nicht eigentlich stark zu nennen.

Aufschwemmungen von 1:10000 Cholesterin in den Kobragiftlösungen hatten ebenfalls nur eine etwas abschwächende Wirkung auf die Vergiftungserscheinungen. Es ist indessen zu bemerken, daß Kaulquappen das Cholesterin durch den Magen aufnehmen, wie an der Entleerung von weißen Exkrementen, die fast gänzlich aus Cholesterin bestehen, leicht zu erkennen ist.

Wenn das Cholesterin vor Einsetzen der Kaulquappen in die Lösung entfernt wird, so ist die abschwächende Wirkung eine deutlichere.

Versuche mit Olivenöl.

Versuch 1. 100 ccm Olivenöl wurden während $^1/_2$ Stunde mit festem Bariumoxyd im Wasserbad gekocht und von den gebildeten Bariumseifen abfiltriert.

Darauf wurden je 25 ccm 1:250000 Kobragift a) mit 10 ccm, b) mit 5 ccm, c) mit 2,5 ccm des gereinigten Olivenöls versetzt und die 3 Mischungen darauf während $^1/_2$ Stunde durch eine Schüttelmaschine geschüttelt. In a) und b) war das Öl nach 1 Stunde scharf von der Wasserlösung getrennt, in c) dagegen war das Öl emulsioniert. Alle Proben wurden filtriert. Filtrate von a) und b) ganz klar, Filtrat von c) schwach opalescierend.

Zu 20 ccm jeder der 3 Filtrate wurden 20 ccm Wasser zugesetzt so daß die Lösungen 1:500000 Kobragift enthalten müßten, wenn ein Teil des Giftes nicht in das Öl übergegangen wäre. Darauf wurden je 2 Kaulquappen in die 3 Lösungen gesetzt. Noch nach 2 Tagen waren alle Kaulquappen lebhaft beweglich, so daß in allen 3 Proben das Öl mehr als die Hälfte der wirksamen Bestandteile des Kobragiftes (oder wenigstens des Neurotoxins) den wässerigen Lösungen entrissen haben mußte.

Versuch 2. 100 ccm Olivenöl wurden mit ca. 25 ccm 20%igem NaOH versetzt, mit Wasser verdünnt, gut durchschüttelt und mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde so lange mit wiederholt gewechseltem Wasser ausgeschüttelt, bis das Waschwasser nicht mehr mit Phenolphthalein reagierte und darauf der Äther auf dem Wasserbade verjagt.

Sodann wurden je 40 ccm einer Lösung von 1:50000 Kobragift mit a) 1 ccm, b) 0,5 ccm und c) mit 0,2 ccm dieses neutralen Öles versetzt und $^1/_2$ Stunde lang (in der Maschine) geschüttelt, worauf in jede Lösung ohne vorhergehende Filtration 1 Kaulquappe zugesetzt wurde.

In Lösungen b) und c) starben die Kaulquappen nach $1^1/_2$ Stunden. In Lösung a) überlebten sie mehr als 24 Stunden. Drei andere Lösungen

a[1], b[1], c[1] wurden auf dieselbe Weise bereitet, aber vor der Einführung der Kaulquappen filtriert.

Um 9[30] a. m. des 12. V. 1910 wurde je 1 Kaulquappe in die filtrierten Lösungen gesetzt.

Um 9[30] a. m. des 13. V. (also nach 24 Stunden) waren die Kaulquappen in den Lösungen a[1] und b[1] noch recht lebhaft, die in c[1] etwas träge.

Um 12[30] p. m. des 13. V.: Kaulquappe in c[1] sehr träge, die in a[1] und b[1] lebhaft.

Um 6[00] p. m. des 13. V.: Kaulquappe in c[1] fast gänzlich unbeweglich.

Um 9[30] a. m. des 14. V.: Kaulquappe in c[1] tot, die in a[1] und b[1] noch lebhaft.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß das Olivenöl den Lösungen ganz bedeutende Mengen Kobragift entzogen hatte. Immerhin ist die abschwächende Wirkung des Öls auf die Intoxikation durch Kobragift viel geringer als die durch Zusatz von Calciumsalzen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß bei den verschiedenen Operationen etwas Kobragift zerstört worden ist.

Anhang.

Verhalten von Kaulquappen in Lösungen von Tetanusgift, Diphtheriegift und Bienengift.

Nach den Erfahrungen mit Kobragift lag der Gedanke nahe, Kaulquappen auch beim Studium der Bakterientoxine zu verwenden. Unsere bisherigen Versuche mit Tetanus- und Diphtheriegiftlösungen führten indessen zu keinem Erfolge, da Kaulquappen sich äußerst unempfindlich gegen Lösungen dieser Gifte erwiesen.

Bekanntlich pflegt man die Stammlösungen dieser Gifte mit Toluol zu versetzen, um sie haltbarer zu machen. Verwendet man daher eine unverdünnte Stammlösung zu Versuchen mit Kaulquappen, so werden diese sehr rasch durch das gelöste und in Suspension befindliche Toluol getötet. Werden die Stammlösungen mit ca. der 10fachen Menge Wasser verdünnt, so tritt sehr rasch Narkose der Kaulquappen ein; diese Narkose wird nach Überführung der Kaulquappen in reines Wasser schon nach wenigen Minuten wieder aufgehoben, sofern die Narkose nicht zu lange gedauert hat. — Wenn aber die Stammgiftlösungen etwas weiter, z. B. mit der 30 oder 40fachen Wassermenge verdünnt werden, so zeigen sich die erhaltenen Lösungen (50 bis 100 ccm Lösung wurden zu den Versuchen verwendet) völlig ohne Wirkung auf Kaulquappen selbst nach 24 bis 36 Stunden, obgleich die Stammlösung der Diphtheriegifte[1]) so stark war, daß 0,01 ccm für 100 g Meerschweinchen tödlich war.

[1]) Die Diphtheriegiftlösung verdanken wir der Güte von Herrn Dr. Madsen.

Es ist allerdings zu bemerken, daß die Versuche bei gewöhnlicher Zimmertemperatur ausgeführt wurden, und es ist nicht unmöglich, daß man bei höherer Temperatur oder mit anderen Bakteriengiften günstigere Erfolge haben wird. Die Zeit reichte nicht aus, die Versuchsbedingungen in wünschenswerter Weise zu variieren.

Mehr Erfolg hatten unsere Versuche mit Bienengift insofern, als sich hier die günstige Wirkung eines Zusatzes von Calciumchlorid zu den Giftlösungen sehr leicht erweisen ließ, obgleich die Wirkung viel geringer als bei Kobragift ist.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß die Giftblasen von ca. 200 (durch Ätherdämpfe getöteten) Bienen mit 8 ccm Wasser zerrieben wurden, die Lösung filtriert und diese Stammlösung sofort zur Bereitung der eigentlichen Versuchslösungen verwendet wurde.

Vorversuche zeigten, daß, wenn Kaulquappen in 0,3 ccm einer solchen Stammlösung + 10 oder 20 ccm Wasser gesetzt wurden, sie in weniger als 1 Stunde starben, wobei in erster Zeit starke periphere Reizung, bald aber zentrale Störungen eintraten. Die Zirkulation erhält sich noch zu einer Zeit, in der die Hautepithelien bereits stark angegriffen sind.

In Gemischen von 0,3 ccm Stammgiftlösung + 40 ccm Wasser waren die peripheren Wirkungen zunächst ziemlich gering, aber die Kaulquappen wurden nach 1 Stunde sehr träge, aber doch noch etwas beweglich. Nach 3 Stunden waren sie schon tot, die Hautepithelien nur wenig angegriffen.

In Gemischen von 0,25 ccm Stammlösung + 100 ccm Wasser lebten Kaulquappen bedeutend länger; nach 12 Stunden waren sie indessen schon sehr träge und starben nach 20 bis 40 Stunden.

Lösungen von 0,25 ccm Stammgiftlösung auf 200 ccm Wasser zeigten sich als im wesentlichen indifferent für Kaulquappen.

In Gemischen von 0,25 ccm Stammgiftlösung + 20 ccm 0,2%iger $CaCl_2$-Lösungen dagegen zeigten Kaulquappen nicht die geringsten Störungen selbst nach 5 bis 6 Tagen; sie starben indessen in Gemischen von 0,25 ccm Stammlösung Bienengift + 10 ccm 0,2%iger $CaCl_2$-Lösungen, aber erst nach viel längerer Zeit als in parallelen Versuchen ohne Zusatz von $CaCl_2$.

Wiederholte, streng parallele Versuche zeigten, daß ein Zusatz von 0,2%igem $CaCl_2$ zu Bienengiftlösungen die Toxizität dieser Lösungen mindestens um 4 bis 6 mal herabsetzt. Selbstverständlich wurde auch bei diesen Versuchen nur krystallisiertes Calciumchlorid ($CaCl_2$ + 6 Aq) zur Bereitung der Lösungen verwendet.

Wegen der geringen Haltbarkeit von Bienengiftlösungen und ihrer weniger charakteristischen resorptiven Wirkungen haben wir indessen die Versuche nicht weiter fortgesetzt.

Zusammenfassung einiger der wichtigeren Resultate.

1. Werden junge Kaulquappen in Lösungen von Kobragift in reinem Wasser gesetzt, so wird das ganze Zentralnerven-

system schon bei Konzentrationen von 1:1000000 innerhalb ca. 24 Stunden vollständig gelähmt; bei sehr reichlichen Mengen Lösung sogar nach längerer Zeit bei 1:1500000.

2. Selbst nach Verweilen in Lösungen von 1:400000 oder 1:500000 Kobragift während mehrerer Tage bleibt die Zirkulation besonders bei nicht zu hoher Temperatur erhalten, und nach Übertragung in reines Wasser können die Kaulquappen sich allmählich, aber recht langsam erholen. Die Vergiftung ist in solchen Lösungen eine reversible.

3. In Lösungen von 1:25000 tritt vollständige Narkose nach ca. 10 bis 15 Minuten ein, bei 1:50000 in ca. 20 bis 25 Minuten, in 1:100000 nach ca. 1 Stunde, in 1:300000 nach ca. 3 bis 4 Stunden.

4. Bei Konzentrationen von mehr als 1:400000 ist die Vergiftung nach Verlauf von einigen Stunden nicht mehr reversibel, indem die Hautepithelien allmählich angegriffen werden, bei Konzentrationen von mehr als 1:100000 sogar recht rasch.

5. Kaulquappen, die bereits ein oder mehreremal durch Kobragift gelähmt gewesen sind, aber nach Überführung in reines Wasser sich erholt haben, wurden bei ca. derselben Konzentration des Kobragiftes wie bei der ersten Vergiftung gelähmt.

6. Das Gift dringt mindestens ebenso schnell, wahrscheinlich noch schneller durch die lebendige, unbeschädigte Haut- und Kiemenepithelien als Chloralhydrat, dagegen etwas langsamer als die meisten anderen Narkotica. Das Eindringen muß sehr viel rascher sein als das von Glycerin und Harnstoff.

7. Die Gegenwart von Calciumsalzen in den Kobragiftlösungen setzt die Toxizität der Lösungen stark herab, um so stärker, je konzentrierter die Calciumlösungen sind. Allzu konzentrierte Lösungen von Calciumsalzen wirken indessen selber schädlich auf Kaulquappen, so z. B. Lösungen von $CaCl_2$ von mehr als $^1/_2$ %. Bei Gegenwart von $^1/_2$ % $CaCl_2$ in einer Kobragiftlösung muß das Kobragift, um die gleichen Wirkungen auszuüben, ca. 100 mal konzentrierter sein als in einer Lösung ohne $CaCl_2$.

8. Sehr verdünnte Lösungen von $Ca(OH)_2$, z. B. solche von 1:50000 wirken bedeutend stärker als äquivalente Lösungen von $CaCl_2$.

9. Magnesium- und Natriumsalze schwächen ebenfalls die Toxizität in Kobragiftlösungen bis zu einem gewissen Grade, aber außerordentlich viel weniger als Calciumsalze.

10. Durch Anwesenheit von Antivenin in Kobragiftlösungen kann die Toxizität der letzteren sehr stark herabgesetzt werden.

11. Das sog. „Neurotoxin" wird von den roten Blutkörperchen aus isotonischen Rohrzuckerlösungen außerordentlich stark gespeichert, bedeutend schwächer aus isotonischen Kochsalzlösungen. Das Neurotoxin ist wahrscheinlich identisch mit dem Hämolysin des Kobragiftes.

12. Die mit Neurotoxin beladenen roten Blutkörperchen können dieses wieder abgeben, wenn die Konzentration des Neurotoxins in die die Blutkörperchen umgebende Lösung abnimmt.

13. Neurotoxin wird mehr oder weniger von Lecithin, Cholesterin und besonders Olivenöl gespeichert. Auch dieser Vorgang ist reversibel.

14. Die Toxizität von Bienengiftlösungen für Kaulquappen wird durch Zusatz von 0,2% $CaCl_2$ ziemlich stark (4 bis 6mal) herabgesetzt, aber doch viel weniger als die von Kobragift.

Das Verhalten der Schardingerschen Reaktion gegenüber Colostralmilch von Kühen.

Von

Richard Reinhardt und Ernst Seibold.

(Aus dem Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztl. Hochschule in Stuttgart.)

(Eingegangen am 29. Januar 1911.)

Im Jahre 1902 hat Schardinger[1]) seine Beobachtung veröffentlicht, wonach frische, ungekochte Milch, mit einer entsprechenden Menge eines Formalin-Methylenblaugemisches versetzt, diese Lösung bei einer optimalen Temperatur von 70° innerhalb 10 Minuten entfärbe, während die Reaktion bei Verwendung von über 70° erhitzter oder mit Wasser vermischter Milch ausbleibe; diese Erscheinung lasse sich zum Nachweis einer stattgehabten Erhitzung der Milch oder einer Verfälschung derselben mit Wasser verwenden.

Die Befunde Schardingers wurden in den folgenden Jahren von verschiedenen Autoren bestätigt, so von Utz[2]), Smidt[3]), Seligman[4]), Brand[5]), Sommerfeld[6]), Raudnitz[7]), Trommsdorff[8]) u. a. Es wurde jedoch von einzelnen die weitere Beobachtung gemacht, daß die Reaktion unter Umständen auch in gekochter oder pasteurisierter Milch

---

[1]) Zeitschr f. Nahrungs- u. Genußmittel 1902, 1113.

[2]) Milchzeitung 1903, 32.

[3]) Hygienische Rundschau 1904, 1137.

[4]) Zeitschr. f. Hygiene 52, 161 und 58, 1.

[5]) Münch. med. Wochenschr. 1907, 821.

[6]) Hygien. Zentralbl. 1908, 1.

[7]) Ergebnisse der Physiologie 2, 1 und Sammelreferate.

[8]) Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 49, 291.

wieder auftreten kann, so daß das Schardinger-Reagens kein absolut sicheres Mittel zur Unterscheidung roher von gekochter Milch darstellt. Und andererseits wurde gefunden, daß die Entfärbung auch einmal in ungekochter Milch ausbleiben kann. So hat Brand (l. c.) mit Milch von 2 Kühen, die eine etwas wässerige Milch lieferten, keine Entfärbung der Mischung erzielen können. Trommsdorff (l. c.) fand ebenfalls einmal, daß keimfrei gewonnene Milch die Reaktion nicht gab.

Neuestens haben zwei nahezu gleichzeitig, aber unabhängig voneinander erschienene Veröffentlichungen, die sich mit der Schardinger-Reaktion befassen, die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt. In den beiden Arbeiten, die Koning[1]) und Schern[2]) zu Verfassern haben, werden die Beobachtungen Schardingers im großen ganzen — allerdings mit gewissen Einschränkungen — bestätigt; die beiden eben genannnten Autoren stellen als Norm den Satz auf, daß 10 ccm Milch von gesunden Kühen, die mindestens 3 Wochen vorher geboren haben, bei Zusatz von 1 ccm Formalin-Methylenblaulösung (F. M.) im Wasserbad von 45° innerhalb 12 Minuten entfärbt werden. Schern weist indes in seiner Veröffentlichung gleichzeitig darauf hin, daß die Reaktion ausbleibt, wenn es sich um Milch aus einem kranken Euter handelt, oder wenn zu dem Versuch Milch von Kühen verwendet wird, die kurz zuvor geboren haben. In der andern Arbeit wird von Koning die Beobachtung Scherns bezüglich des Ausbleibens der Entfärbung bei Milch von frischmilchenden Kühen bestätigt. Bei der Untersuchung von kranker Milch aber kommt Koning zu einem andern Resultat als Schern; er hat gefunden, daß solche Milch Formalin-Methylenblaulösung auffallend rasch entfärbt.

Da die Untersuchungsergebnisse der beiden Autoren in manchen Punkten nicht ganz übereinstimmen, erschien es uns angezeigt, weitere diesbezügliche Untersuchungen anzustellen, um so mehr, als Koning und Schern geneigt sind, aus ihren Untersuchungsergebnissen zum Teil ziemlich weitgehende Folgerungen zu ziehen, Folgerungen, die, falls ihre Richtigkeit bestätigt werden könnte, der Schardinger-Reaktion eine große Bedeutung für die praktische Milchhygiene und für das Molkereiwesen sowohl als für die forensische Veterinärmedizin verleihen würden.

Eigene Untersuchungen.

I. Milch von frischmilchenden Kühen.

Bei Anstellung unserer Untersuchungen war es uns zunächst darum zu tun, festzustellen, ob bei Milch von „frisch-

[1]) Koning, Biologische und biochemische Studien über Milch. Leipzig 1908.

[2]) Schern, Diese Zeitschr. 18, 261, 1909.

milchenden"[1]) Kühen die Schardingersche Reaktion tatsächlich ausbleibt, sodann, wie lange nach der Geburt das Nichteintreten der Reaktion bestehen bleibt, und ferner, ob sich bezüglich der Zeit des Wiedereintritts der Reaktion eine gewisse Gesetzmäßigkeit nachweisen läßt. Endlich sollten unsere Untersuchungen dartun, ob in der Milch „frischmilchender" Kühe das Schardinger-Ferment überhaupt fehlt.

Zu den gedachten Zwecken verwandten wir für die Untersuchungen ausschließlich Milch von Kühen, die in der geburtshilflichen Klinik der hiesigen tierärztlichen Hochschule geboren hatten, von denen also Zeit und Verlauf der Geburt ganz genau bekannt war. Die Milch der einzelnen Tiere wurde unmittelbar nach der Geburt und dann weiterhin in gewissen Zeitabschnitten möglichst oft und möglichst lange, bzw. bis zum bleibenden Wiedererscheinen der normalen Schardinger-Reaktion untersucht. Die Entnahme der Milch erfolgte teils durch gewöhnliches Melken, teils auf sterile Weise. In letzterem Falle bedienten wir uns nach vorherigem Abwaschen und nach Desinfektion des Euters und speziell der Zitzen mittels Alkohols, der von Trommsdorff (l. c.) als sehr zweckmäßig empfohlenen sterilen Melkröhrchen. Wir haben übrigens die Brauchbarkeit dieser Art von Milchentnahme schon gelegentlich von zu andern Zwecken vorgenommenen Milchuntersuchungen[2, 3]) kennen und schätzen gelernt. Auf die Anlegung von Plattenkulturen zur Kontrolle der Sterilität der Milch glaubten wir verzichten zu dürfen, nachdem der eine von uns (Seibold, l. c.) früher schon durch zahlreiche systematische Untersuchungen nachgewiesen hat, daß man auf die beschriebene Weise eine vollständig sterile Milch oder doch eine Milch erhält, die nur eine ganz geringe, für unsere Untersuchungszwecke belanglose Keimzahl aufweist.

Zu den Untersuchungen wurde die aus allen vier Eutervierteln zusammengemolkene Milch — in den Tabellen kurz als Mischmilch be-

---

[1]) Wir gebrauchen hier den Ausdruck „frischmilchend" und später „altmilchend" im Sinne Schorns; wir wollen damit das ungefähre Stadium der Lactation der Kühe, die wir zu unsern Versuchen herangezogen haben, bezeichnen.

[2]) Bub, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Orig. 27, 321.

[3]) Seibold, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Orig. 55, 301.

zeichnet — verwendet. Wo aus besonderen Gründen die Milch einzelner Viertel untersucht worden ist, ist dies ausdrücklich bemerkt worden. Wir benutzten im allgemeinen ein Wasserbad von 45°; in den meisten Fällen wurden gleichzeitig ein oder zwei Kontrollversuche bei 65° angesetzt. In allen Fällen kam das von Schern zusammengestellte und für die Schardinger-Probe empfohlene Thermodiaskop zur Anwendung, das von Schern in den Monatsh. f. prakt. Tierheilkunde 21, 171 näher beschrieben und abgebildet ist und die Untersuchungen nicht unwesentlich vereinfacht.

Wir haben stets zwei, zuweilen auch drei gleiche Proben gleichzeitig untersucht. Wir verwandten stets 10 ccm Milch, denen jeweils 1 ccm des von Paul Altmann in Berlin bezogenen Schardinger-Reagenses (5 ccm gesättigte, alkoholische Methylenblaulösung + 5 ccm Formalin + 190 ccm Wasser) zugesetzt wurde. Bei Fall 1 wurde neben der steril und der nicht steril entnommenen Colostralmilch zur Prüfung der Farbstofflösung gleichzeitig je eine Probe gewöhnlicher Handelsmilch mituntersucht. Im übrigen wurden die Milchproben möglichst bald nach der Entnahme und dann innerhalb der nächsten 24 Stunden in verschieden großen Intervallen, insgesamt 3 bis 5mal, untersucht, wobei die Milch vom einen zum andern Tag bei Zimmertemperatur (15 bis 20°) aufbewahrt wurde. Im übrigen wurden die einzelnen Reaktionszeiten der verschiedenen Untersuchungen nur dann in die Tabellen aufgenommen, wenn sie wesentliche Abweichungen von denen der 1. Untersuchung zeigten. Bevor der Versuch angesetzt wurde, wurden die Milchproben gründlich geschüttelt, so daß sich der Rahm in der Milch gleichmäßig verteilte. Nach dem Abpipettieren der Milch und der Farbstofflösung wurden die Röhrchen nach Verschluß mit dem Daumen so oft umgekehrt, bis die Milch gleichmäßig blau gefärbt war und kein Farbstoff mehr an der Wand des Röhrchens haftete. Dann wurden die Proben ins Wasserbad gestellt.

Da Schern das frühere oder spätere Wiederauftreten der Schardinger-Reaktion in der Milch von frischmilchenden Kühen mit dem Saugenlassen des Kalbes am Euter in Zusammenhang bringen will, so wurde auch diesem Umstand Beachtung geschenkt.

Es braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden, daß die die Untersuchungsmilch liefernden Kühe jeweils auf ihren Gesundheitszustand und besonders eingehend auf gesunde Beschaffenheit des Euters untersucht worden sind. Wo sich irgendwelche Abweichungen von der Norm gezeigt haben, wurde dies besonders bemerkt.

Die Entfärbung der Mischungen trat in der Regel von unten nach oben ein; wo ein anderes Verhalten sich zeigte, wurde es in den Tabellen besonders hervorgehoben. In manchen Fällen ist die Entfärbung so rasch und gleichmäßig erfolgt, daß nicht festgestellt werden konnte, ob die Entfärbung von unten oder von oben her erfolgt ist.

Alles Weitere ist aus den tabellarisch zusammengestellten Protokollauszügen zu entnehmen, die wir nunmehr folgen lassen:

Tabelle I.

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Reaktionszeit der Kontroll-Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7	8
Fall 1. Kuh Nr. 112. Ostfriese, 6 J. alt, hat am 5. VI. 10 10^h nachts normal geboren. Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Es besteht Hyperämie u. Schwellung des h. r. Euterviertels u. Schwellung der zugehör. Lymphdrüse. Allgemeinbefinden ist nicht gestört.	11. VI. 10 10^h v.	1.	$10^h 40'$ v.	6'	8'	5'	Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch. Zur Kontrolle wurde gewöhnl. (altmelkige) Handelsmilch untersucht. Die Entfärb. tritt deutlich von unten nach oben ein.
		3.	$2^h 52'$ n.	8'	16'	8'	
		4.	$5^h 18'$ n.	>30' [1]	27'	10'	
	13. VI. 9^h v.	1.	$9^h 27'$ v.	13'	18'	24'	
				12'	16'	21'	Mischmilch aus allen 4 Vierteln. Die Handelsmilch erscheint gleich beim Kauf geronnen; bei der Alkoholprobe zeigen sich feine Gerinnsel.
		2.	$11^h 45'$ v.	11'	14'	27'	
		3.	$2^h 48'$ n.	19'	24'	16'	
		4.	$4^h 44'$ n.	22'	23'	10'	
	16. VI. $8^h 50'$ v.	1.	$9^h 10'$ v.	10'	>40'		Der Versuch konnte nicht fortgesetzt werden, da die Kuh verkauft wurde.
Fall 2. Kuh Nr. 136, Höhenrasse, hat am 15. VI. 10 abds. 8^h normal geboren. Nachgeb. rechtzeit. abgestoßen. Leichtes Euterödem. Allgemeinbefind. nicht gestört.	17. VI. $8^h 45'$ v.	1.	9^h v.	30'	80'		Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch. Die Milchproben und das Reagens werden abpipettiert.
		2., 3. u. 4.	$11^h 08'$ v.	>60'	>60'		
	18. VI.			„	„		
	20. VI.			„	„		
	22. VI.			„	„		
	1. VII. $8^h 45'$ v.	1.	$2^h 26'$ n.	—	9'		Bei Vornahme weiterer Untersuchungen am 5. u. 12. VII. ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede.
Fall 3. Kuh Nr. 138, Höhenrasse, 10 J. alt, hat am 17. VI. 10 12^h nachts gebor. Ausstoßung der Nachgeb. erfolgt erst am 20. VI. früh. Euter normal. Allgemeinbefind. nicht gestört.	20. VI. $8^h 30'$ v.	1.	10^h v.	>60'	>60'		Kalb saugt am Euter. Mischmilch.
	22. VI.			„	„		
	24. VI.			„	„		
	1. VII. 10^h v.	1.	$2^h 30'$ n.	—	16'		Kalb wird heute abgestoßen.
	5. VII. $3^h 30'$ n.	1.	$5^h 25'$ n.	—	>60'		Kuh zeigt Störung des Allgemeinbefind.; Temp. 39,9° C; Puls 75; Futteraufnahme, Wiederkäuen, Milchsekretion vermindert. Euter gesund. Kuh wird am 6. VII. wegen Metritis purul. geschlachtet.

[1] >30' = größer als 30', d. h. innerhalb 30' ist keine Entfärbung eingetreten.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 4. Kuh Nr. 141, Höhenrasse. 8 J. alt, hat am 23. VI. 10 morgens 3^h geboren; Ausstoßung der Fruchthüllen erfolgte rechtzeitig. Euter normal. Allgemeinbefinden nicht gestört.	23. VI. 8^h 30′ v.	1.	8^h 51′ v.	9′	39′	Das Kalb saugt am Euter. Mischmilch.
		4.	5^h n.	8′	>60′	
	24. VI. 8^h 45′	1.	9^h v.	25′	>90′	
	27. VI.	1.	8^h 51′ v.	>60′	>60′	Die 2. und 3. Untersuchung, sowie die Untersuchungen v. 29. VI. hatten dasselbe Ergebnis; Restmilch entfärbte in 10′. Das Kalb wurde am 4. VII. abgestoßen.
	6. VII. 9^h 30′ v.	1.	11^h 22′ v.	—	22′	
	18. VII. 9^h 45′ v.	1.	11^h 24′ v.	—	15′	
		2.	4^h n.	—	22′	
					>60′ [1]	Bei den Untersuchungen vom 25. VII., 1., 8. u. 16. VIII. schwanken die Reaktionszeiten bei 45° zwischen 11 u. 45′, bei 65° zwischen 8 u. 50′, bzw. ist nach 60′ nur eine Aufhellung festzustellen.
		3.	6^h 10′ n.	—	20′	
		4.	9^h 54′ v.	—	13′	
					28′ [1]	
	23. VIII. 9^h 30′ v.	1.	10^h 30′ v.	—	17′	
					40′ [1]	
		4.	9^h v.	—	6′	
					6′ [1]	Bei den Untersuchungen vom 30. VIII., 7., 14. u. 21. IX. schwanken die Reaktionszeiten bei 45° zwischen 9 u. 29′, bei 65° zwischen 5 u. 29′, bzw. tritt in 60′ nur Aufhellung ein.
	27. IX. 9^h 25′ v.	1.	10^h 25′ v.	—	>60′	
		2.	2^h 16′ n.	—	— [2]	
	5^h 15′ n.	1.	8^h n.	—	>60′	
		2.	9^h v.	—	3′ [3]	
	24. X. 8^h 30′ v.	1.	11^h v.	—	>60′	Mischmilch. Allgemeinbefinden gut. Euter gesund.
Fall 5. Kuh Nr. 139, Höhenrasse, hat am 22. VI. 2^h früh geboren. Ausstoßung d. Nachgeburt am 22. VI. 6^h vorm. Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal.	23. VI. 8^h 30′ v.	1.	8^h 51′ v.	—	>60′	Kalb saugt a. Euter. Mischmilch. Gleiche Ergebnisse liefern die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 25. u. 27. VI. u. v. 1. VII. Desgl. die Untersuchungen bei der Milchentnahme am 6. VII.
	5. VII. 4^h n.	1.	5^h 25′ n.	—	30′	
	18. VII. 10^h 30′ v.	1.	11^h 24′ v.	—	12′	
				—	27′ [1]	
		4.	9^h 54′ v.	—	9′	
				—	5′ [1]	
	25. VII. 10^h 30′ v.	1.	2^h 40′ n.	—	24′	Bei den Untersuchungen vom 1., 8., 16. u. 30. VII. schwanken die Reaktionszeiten bei
		2.	4^h 50′ n.	—	>60′	

[1]) Bei 65°.

[2]) Mit dem Rahm aus 60 ccm Milch tritt innerhalb 1 Stunde nur Aufhellung ein.

[3]) Rahm aus 150 ccm Milch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 5.	2. IX. $8^h 40'$ v.	1.	$11^h 48'$ v.	—	9'	45° zwischen 4 u. 30', bei 65° zwischen 2 u. 7'; am 1. VIII. war bei 65° nach 1 Stunde nur Aufhellung zu sehen.
				—	3' 1)	
		4.	$8^h 40'$ v.	—	7'	
				—	10' 1)	
Fall 6. Kuh Nr. 137, Höhenrasse, 8 J. alt, hat am 25. VI. 10 abds. 8^h geboren; Ausstoßung der Nachgeb. rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	27. VI. 10^h v.	1.	$10^h 01'$ v.	—	8'	Mischmilch; dieselbe ist noch deutlich gelb gefärbt (Colostralmilch).
	28. VI. $8^h 30'$ v.	1.	$8^h 49'$ v.	>60'	>60'	Mischmilch. Kalb saugt.
	28. VI. 2^h n.	1.	2^h n.	—	6'	
		2.	4^h n.	—	8'	
	30. VI. $8^h 30'$ v.	1.	9^h v.	>60	>60'	Desgl. die 2., 3., 4. Untersuchung und die vom 2. VII. Die betr. Restmilch entfärbt jeweils in 7 bis 12'.
	8. VII. $8^h 45'$ v.	1.	$11^h 18'$ v.	—	12'	
				—	20' 1)	Desgl. die 2. und 3. Unters.
	13. VII. 9^h v.	1.	$11^h 30'$ v.	—	16'	Bei den Untersuchungen am 22. u. 26. VII. betragen die Reaktionszeiten bei 45° 3 bis 9', bei 65° 2 bis 4'. Kalb wurde am 22. VII. abgestoßen.
		2.	$2^h 30'$ n.	—	25'	
		3.	$4^h 30'$ n.	—	>60'	
		4.	$8^h 44'$ v.	—	14'	
	28. VII. 9^h v.	1.	$9^h 43'$ v.	—	9'	
				—	8' 1)	
Fall 7. Kalbin Nr. 131, Höhenrasse, $2^1/_2$ J. alt, hat am 25. VI. 10 nachts $11^h 30'$ geboren. Ausstoßg. der Nachgeburt erfolgte rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euterödem.	27. VI. 10^h v.	1.	10^h v.	—	10'	Mischmilch.
		2.	12^h v.	—	13'	
		3.	4^h n.	—	18'	
		4.	$6^h 10'$ n.	—	20'	
	28. VI. $8^h 30'$ v.	1.	$8^h 49'$ v.	25'	>60'	Wie oben. Kalb saugt.
		2.	$10^h 46'$ v.	>60'	—	
	2^h n.	1.	2^h n.	—	12'	
		2.	4^h n.	—	20'	
	30. VI. $8^h 30'$ v.	1.	$10^h 20'$ v.	>60'	>60'	Gleiche Ergebnisse liefern die 2. u. 3. Untersuchung, sowie die vom 2. VII. Restmilch entfärbt jeweils in 6 bis 9'.
	6. VII. $9^h 15'$ v.	1.	$11^h 32'$ v.	—	7'	Die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die Unters. v. 18. u. 25. VII. liefern keine wesentlich verschied. Ergebnisse. Bei 65° tritt Entfärb. teilweise schon in 2 bis 3' ein. Kalb am 20. VII. abgestoßen.

1) Bei 65°.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milch-entnahme	Zahl d. Unter-suchungen	Zeit der Unter-suchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 8. Kuh Nr. 140, Simmentaler Rasse, hat am 1. VII. 10 normal gebor. Nachgeburt rechtzeit. abgegangen. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	4. VII. $5^h 30'$ v.	1.	$8^h 30'$ v.	—	>60'	Mischmilch. Das Kalb saugt. Gleiche Ergebnisse liefern die 2., 3. u. 4. Untersuchung, sowie die vom 6. VII. Restmilch entfärbt jeweils in 7 bis 12'.
	15. VII. $5^h 30'$ n.	1.	$8^h 11'$ n.	—	15'	
		2.	$9^h 57'$ v.	—	14'	
					27' [1]	
	27. VII. 3^h n.	1.	$5^h 35'$ n.	—	30'	
				—	>60' [1]	
		2.	$8^h 32'$ v.	—	>60'	
	10. VIII. 9^h v.	1.	11^h v.	—	13'	Das Kalb ist abgestoßen.
				—	180' [1]	Milch, die gewonnen wurde, nachdem dem Euter 150 ccm Milch entnommen waren, entfärbte bei 45° in 6 bis 12', bei 65° in 30 bis 44'.
	17. VIII. 9^h v.	1.	11^h v.	—	24'	Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.
				—	>60' [1]	Milch, die gewonnen wurde, nachdem dem Euter 150 ccm entzogen waren, entfärbte bei 45 u. 65° innerhalb 4 bis 10'.
	31. VIII. 10^h v.	1.	11^h v.	—	>60'	Gleiche Ergebnisse lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 8., 15., 22., 28. IX. u. v. 25. X. sowohl bei 45° als bei 65°. Durch Stehenlassen gewonnener Rahm entfärbte in 4 bis 15'.
Fall 9. Kuh Nr. 142, Simmentaler Kreuzung, hat am 9. VII. 10 mittags 12^h geboren. Ausstoßg. der Nachgeburt rechtzeitig. Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal.	11. VII. $8^h 30'$ v.	1.	9^h v.	>60'	>60'	Kalb saugt. Mischmilch. Dasselbe Ergebnis lieferten die 2., 3., 4. u. 5. Unters., sowie die vom 13., 14. u. 16. VII. Restmilch entfärbte jeweils in 9 bis 14'.
	16. VII. $5^h 30'$ v.	1.	10^h v.	—	>60'	
				—	14' [2]	
		2.	$3^h 24'$ n.	—	>60'	
				—	7' [2]	
	25. VII. 11^h v.	1.	$2^h 40'$ n.	—	12'	
					>60' [1]	Kalb ist am 28. VII. abgestoßen worden.
	1. VIII. $9^h 15'$ v.	1.	$10^h 51'$ v.	—	5'	
				—	2' [1]	Genau so wie die Untersuchgn. v. 1. VIII. verliefen die v. 8. u. 12. VIII.

[1]) Bei 65°.
[2]) Restmilch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milchentnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Fall 10. Kuh Nr. 144, Höhenrasse, hat am 13. VII. 10 vorm. 9^h normal gebor.; Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Allgemeinbefinden ist nicht gestört. Euter normal.	14. VII. 8^h 30′ v.	1.	10^h 35′ v.	6′ 4′ [1]	6′ 5′ [1]	Kalb saugt. Mischmilch. Bei den Untersuchungen vom 14. u. 16. VII. entfärbte Restmilch bei 45° in 4 bis 6′, bei 65° in $2^1/_2$ bis 4′.
	16. VII. 8^h 30′ v.	1. 2.	10^h v. 12^h v.	— —	14′ >60′ [1]	
	18. VII. 6^h 30′ v.	1.	11^h v.	—	>60′	Dasselbe Ergebn. lieferten auch die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 20. u. 26. VII., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch entfärbt jeweils in 4—13′.
	2. VIII. 6^h v.	1.	10^h v.	— —	30′ >60′ [1]	Allgemeinbefind. gut; Freßlust gering. Euter norm. Kalb wird heute abgesetzt. Die Körpertemp. ist häufigen Schwankgn. unterworfen; Kuh zeigte bald Fieber, bald war sie fieberfrei. Restmilch entfärbte in $2^1/_2$—5′.
	6. VIII. 6^h 30′ v.	1.	8^h 30′ v.	—	>60′	Gleiche Ergebnisse bei 65°. Restmilch entfärbte bei 45° in 4—5′, bei 65° in $1^1/_2$—$2^1/_2$′.
Fall 11. Kuh Nr. 145, Höhenrasse, hat am 14. VII. 10 nachm. 3^h normal geboren; Nachgeburt ist rechtzeitig abgegangen. Allgemeinbefind. gut; h. r. Euterviertel hyperämisch.	15. VII. 5^h 30′ v.	1.	11^h 14′ v.	—	>60′	Kalb saugt. Mischmilch; der Milch sind rote Blutkörperch. beigemischt. Am 18. VII. war d. Euter wieder normal. Dasselbe negat. Ergebnis lieferten auch die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 18. u. 20. VII. Restmilch entfärbte bei 45° in 7—30′, bei 65° in 3—27′.
	25. VII. 11^h v.	1.	2^h 40′ n.	— —	10′ 25′ [1]	
	1. VIII. 10^h v.	1.	10^h 51′ v.	—	>60′	Dasselbe negat. Ergebnis lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die v. 8. u. 16. VIII. Nur bei der 4. Unters. v. 8 VIII. trat nach 20′ Entfärbung ein. Kalb wurde am 14. VIII. abgestoßen.
	23. VIII. 9^h v.	1.	10^h 50′ v.	— —	10′ 55′ [1]	
	30. VIII. 11^h v.	1. 4.	11^h 30′ v. 8^h 40′ v.	— — — —	12′ 41′ [1] 10′ 5′ [1]	Wie oben. Mischmilch.
	7. IX. 10^h v.		11^h 22′ v.	—	>60′	Wie oben. Mischmilch.

[1] Bei 65°.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milch-entnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Unter-suchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 11.	14. IX. 9^h 45' v.	1.	10^h 36' v.	—	>60'	Wie vorher (S. 302. Dasselbe negative Ergebnis lieferten die 2. u. 3. Unters., sowie die vom 21. IX., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°.
	27. IX. 9^h v.	1.	10^h 25' v.	—	>60'	
		2.	2^h 16' n.	—	25' 1)	Allgemeinbefind. nicht gestört; hinteres r. Euterviertel zeigt sich verhärtet, nicht schmerzhaft, r. Euterlymphdrüse vergrößert. Mischmilch.
	5^h 30' n.	1.	8^h 05' n.	—	>60'	
		2.	9^h 07' v.	—	60' 2)	
	24. X. 8^h 30' v.	1.	10^h 57' v.	—	>60'	
Fall 12. Kuh Nr. 146, Gelbschecke, Höhenrasse, hat am 15. VII. 10 vorm. 6^h normal geboren; die Ausstoßung der Nachgeburt ist rechtzeitig erfolgt.	15. VII. 9^h v.	1.	11^h 14' v.	—	20'	Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal. Kalb saugt. Mischmilch.
				—	6' 3)	
	18. VII. 5^h 30' v.	1.	8^h 34' v.	—	>60'	Wie oben. Mischmilch. Dasselbe negat. Ergebnis lieferten die 2., 3. u. 4. Unters., sowie die Untersuchungen v. 20. u. 26. VII., u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch entfärbte bei 45° in 6—32', bei 65° in 2—3'.
	4. VIII. 8^h v.	1.	9^h 16' v.	—	10'	Kalb ist abgestoßen, sonst wie oben. Mischmilch.
	9. VIII. 9^h v.	1.	10^h 28' v.	—	6'	Wie oben. Die Untersuchungen vom 12. u. 16. VIII. lieferten keine wesentlich verschied. Ergebnisse.
Fall 13. Kuh Nr. 143, Gelbschecke, Höhenrasse, hat am 15. VII. 10 vorm. 6^h 15' normal geboren; Nachgeburt ist rechtzeit. ausgestoßen worden.	15. VII. 9^h v.	1	11^h 14' v.	—	>60'	Allgemeinbefind. nicht gestört. Euter normal. Kalb saugt. Mischmilch.
				—	>60' 3)	
		2.	2^h 52' n.	—	>60'	
				—	28' 3)	
	18. VII. 5^h 30' v.	1.	8^h 34' v.	—	>60'	Wie oben. Mischmilch. Abgesehen von der 4. Unters., bei der in 17' Entfärb. eintrat, lieferten die 2. u. 3. Unters., sowie die Unters. v. 20. u. 25. VII. u. v. 1. VIII. dasselbe neg. Ergebnis, u. zwar sowohl bei 45° als bei 65°. Restmilch

1) Rahm aus 60 ccm Milch.

2) Rahm aus 100 ccm Milch.

3) Restmilch.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nähere Bezeichnung	Zeit der Milch-entnahme	Zahl d. Untersuchungen	Zeit der Untersuchungen	Reaktionszeit der sterilen Milch	Reaktionszeit der nicht sterilen Milch	Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7
Forts. v. Fall 13.						entfärbte bei 45° in 4—30′, bei 65° in $2^1/_2$—4′.
	8. VIII. 9^h v.	1.	$10^h 21'$ v.	—	40′	Wie vorher. Kalb ist abgestoßen. Mischmilch.
				—	>60′ [1]	
	16. VIII. 9^h v.	1.	$11^h 06'$ v.	—	8′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	15′ [1]	
		4.	$8^h 32'$ v.	—	$7^1/_2$′	
					3′	
	23. VIII. $8^h 45'$ v.	1.	$10^h 50'$ v.	—	5′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	5′ [1]	
		4.	$9^h 08'$ v.	—	5′	
				—	2′ [1]	
	30. VIII. $8^h 45'$ v.	1.	$11^h 31'$ v.	—	10′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	22′ [1]	
		4.	$8^h 40'$ v.	—	6′	
				—	3′ [1]	
	7. IX. 9^h v.	1.	$11^h 22'$ v.	—	>60′	Wie vorher. Mischmilch.
		2.	$4^h 18'$ n.	—	20′	
		3.	$6^h 42'$ n.	—	18′	
		4.	$9^h 06'$ v.	—	7′	
				—	4′ [1]	
	14. IX. $8^h 30'$ v.	1.	$10^h 36'$ v.	—	>60′	Wie vorher. Mischmilch.
				—	>60′ [1]	
	21. IX. $9^h 20'$ v.	1.	$10^h 56'$ v.	—	23′	Wie vorher. Mischmilch.
					>60′ [1]	
	27. IX. $9^h 10'$ v.	1.	$10^h 25'$ v.	—	>60′	Allgemeinbefinden nicht gestört. Euter normal. Rechte Euterlymphdrüse geschwollen. Mischmilch.
		2.	$2^h 16'$ n.	—	80′ [2]	
	$6^h 30'$ n.	1.	$8^h 05'$ab.	—	>60′	
		2.	$9^h 07'$ v.	—	nach 60′ weiß mit blauem Schimmer [3]	
	24. X. $5^h 30'$ n.	1.	$8^h 14'$ab.	—	21′	
		2.	$8^h 41'$ v.	—	16′	

[1]) Bei 65°.
[2]) Rahm aus 60 ccm Milch.
[3]) Rahm aus 150 ccm Milch; Rahmschicht gering.

Zu den Tabellen haben wir zunächst zu bemerken, daß bei Fall 1, 2, 3, 5 und 11 eine mehr oder weniger starke Hyperämie und Ödem des Euters bestanden hat, was ja bei Kühen vor und unmittelbar nach dem Gebären die Regel ist. Wir möchten daher die Milch dieser Tiere nicht als pathologisch ansehen. Dagegen waren die Tiere des Falles 3 und 10 fieberhaft erkrankt, weshalb die Untersuchungsergebnisse der als abnorm anzusehenden Milch dieser beiden Tiere für unsere Betrachtungen ausschieden.

Wir haben oben schon erwähnt, daß Koning und Schern es als Regel aufstellen, daß die Milch von gesunden Kühen etwa 3 Wochen nach dem Gebären keinerlei Abweichungen von der Norm mehr aufzuweisen haben, daß somit die frische, ungekochte Milch „altmilchender" Kühe das Schardinger-Reagens im Wasserbad von 45° innerhalb 12 Minuten entfärbt. Aus den vorstehenden Protokollen entnehmen wir, daß die Schardinger-Reaktion bei Colostralmilch, die unmittelbar nach der Geburt dem Euter entzogen worden ist, in der Regel bald, wenn auch nicht immer, schon innerhalb 12 Minuten eintritt und während der ersten 2 bis 3 Tage ausnahmsweise einmal auch noch in den nächstfolgenden Tagen nach der Geburt nachzuweisen ist; gleiche Ergebnisse in dieser Beziehung hatte auch schon Schern (l. c. S. 271 und 273), während Koning (l. c. S. 35 und 89) fand, daß die Milch während der Colostralperiode nicht oder nur sehr langsam entfärbt. In den folgenden Tagen aber verschwindet die Reaktion, um nach einer mehr oder weniger langen Zeit wieder zum Vorschein zu kommen. Es haben also unsere Untersuchungen die Wahrnehmungen Konings und Scherns, daß in Milch von „frischmilchenden" Kühen die Schardinger-Reaktion ausbleibt oder wenigstens nicht in der geforderten Zeit von 12 Minuten eintritt, im allgemeinen bestätigt.[1]) Es gibt jedoch Ausnahmen nach der einen und anderen Richtung; wir haben Fälle verzeichnet, wo — abgesehen von der Entfärbung der Milch unmittelbar nach der Geburt — die Reaktion auffallend bald nach der Geburt sich wieder zeigte (siehe Fall 2, 7, 9 und 12), und andrerseits solche, wo die Entfärbung außerordentlich lange Zeit nach der Geburt ausgeblieben ist (siehe Fall 4, 8, 11 und 13). Auch die zwischen diesen Extremen liegenden Fälle variieren in der Zeit so stark, daß es schwer ist, mittlere Werte anzugeben; man könnte allenfalls sagen, daß der Wiedereintritt der Schardinger-Reaktion innerhalb 3 bis 8 Wochen nach der Geburt in der Regel zu erwarten ist.

Bestimmte Ursachen für ein sehr frühes oder sehr spätes Erscheinen der Schardinger-Reaktion nach der Geburt haben wir, wenn

---

[1]) Erst bei Abschluß unserer Arbeit erhielten wir Kenntnis von der Veröffentlichung: Sassenhagen, Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- und Mastitismilch, Stuttgart 1910. Was dort über die Beziehungen der Colostralmilch zum Schardinger-Reagens gesagt ist, stimmt im großen ganzen mit unseren Untersuchungsergebnissen überein.

wir von den beiden oben erwähnten Erkrankungsfällen absehen, nicht nachweisen können. Auch Schern hat in mehreren Fällen ein auffallend frühes Eintreten der Reaktion nach der Geburt feststellen können (l. c. S. 271 und 272) und wollte dies auf das Nichtsaugenlassen des Kalbes am Euter der Mutter zurückführen. Wir haben keine Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Annahme finden können; denn bei allen unseren frischmilchenden Kühen, deren Milch wir untersucht haben, haben die Kälber längere Zeit am Euter gesogen. Trotzdem haben wir die bedeutenden Schwankungen im Wiederauftreten der Reaktion.

Daß schwere, insbesondere mit Fieber verlaufende Allgemeinerkrankungen und speziell Erkrankungen des Euters von Einfluß auf die Schardinger-Reaktion sind, geht aus den Fällen 3 und 10 hervor. Ob aber rasch vorübergehende, leichte, klinisch nicht wahrnehmbare Allgemeinerkrankungen, oder solche des Euters die Milchsekretion in der Weise beeinflussen können, daß der die Reaktion auslösende Körper das eine Mal früher als sonst nach der Geburt auftritt, das andere Mal verschwindet, ist zweifelhaft; ganz von der Hand weisen läßt sich diese Vermutung nicht, da wir auf Grund sonstiger Beobachtungen wohl wissen, daß der betreffende Körper sehr empfindlich ist, aber nicht darüber orientiert sind, welcher Art und Herkunft er ist.

Eine vorübergehende Euterhyperämie oder ein Euterödem ist offenbar von keinem merklichen Einfluß auf den Ablauf der Reaktion, wie die Fälle 1, 2, 3 und 5 zeigen.

Eine besondere Stellung nehmen die Fälle 8, 11 und 13 ein. Bei Fall 11 ist 10 Tage nach der Geburt die Schardinger-Reaktion vorhanden, dann verschwindet sie, um nach einigen Wochen sich wieder zu zeigen und nach weiteren 14 Tagen wieder zu verschwinden. Ähnliche Schwankungen im Auftreten und Ausbleiben der Reaktion zeigen auch die beiden anderen eben erwähnten Fälle. Bei der Kuh Nr. 8 konnten abnorme Zustände irgendwelcher Art nicht aufgefunden werden. Bei Fall 11 zeigte sich das hintere rechte Euterviertel der Kuh verhärtet, die zugehörige Euterlymphdrüse vergrößert. Bei Kuh Nr. 13 hat sich nur die eine Euterlymphdrüse vergrößert gezeigt. In beiden Fällen aber hat es sich um alte, völlig abgelaufene Prozesse gehandelt; wir möchten sehr bezweifeln, daß diese von Einfluß auf die Beschaffenheit der Milch gewesen sind, um so mehr, als bei anderen Untersuchungen (Alkoholprobe) die Milch als gesund und einwandfrei sich erwiesen hat.

Bei der Milch einzelner Kühe ist die Reaktion außerordentlich spät nach der Geburt oder zurzeit des Abschlusses unserer Untersuchungen überhaupt noch nicht bzw. nicht in der geforderten Zeit zum Vorschein gekommen, obwohl in den einzelnen Fällen schon 101 bzw. 102, 116 und 123 Tage seit der letzten Geburt verflossen waren und besondere Gründe, wie Erkrankungen usw., nicht vorlagen. Auch Trommsdorf und Schern haben je bei einer offenbar von einer „alt-

milchenden" Kuh herrührenden Milch Ausbleiben der Reaktion, und Schern in einem weiteren Falle verzögertes Eintreten der Entfärbung ohne nachweisbare Ursache wahrgenommen. Brand wollte bei 2 Kühen, deren Milch sich dem Schardinger-Reagens gegenüber abnorm verhielt, die Fettarmut als Ursache hierfür beschuldigen. Auf Fettarmut der Milch konnten wir in unseren Fällen die Verzögerung bzw. das Ausbleiben der Reaktion nicht beziehen, denn die betreffenden Milchproben zeigten beim Stehenlassen oder Zentrifugieren reichliche Fettabscheidung.

Es bleibt also die Ursache für das abnorme Verhalten der Milch in den erwähnten Fällen dunkel. Vielleicht ist die Ursache in inneren, uns nicht näher bekannten, nach außen sich nicht bemerkbar machenden Störungen in der Milchsekretion oder in einer besonderen Empfindlichkeit des die Entfärbung herbeiführenden Enzyms zu suchen. Wir dürfen wohl auch annehmen, daß unter den einzelnen Tieren große individuelle Schwankungen in der Enzymproduktion bestehen: Die eine Kuh besitzt die Eigenschaft, viel Enzym zu liefern, die andere hat eine geringere Fähigkeit hierzu. Dafür, daß die Rasse von Einfluß auf die Enzymproduktion ist, haben wir keine Anhaltspunkte gefunden. Jedenfalls steht so viel fest, daß das zeitliche Wiederauftreten der Schardinger-Reaktion in der Milch nach der Geburt großen Schwankungen unterliegt, Schwankungen, deren Ursachen häufig außer dem Bereich unserer Feststellungen liegen. So kommt es, daß wir bezüglich der Zeit des Wiedereintretens der Schardinger-Reaktion nach der Geburt eine bestimmte Norm nicht aufstellen können.

Übrigens haben unsere Untersuchungen ergeben, daß das Schardinger-Enzym nie, auch nicht in der Milch frischmilchender Kühe, ganz fehlt. Ausgehend von der von verschiedenen Untersuchern (Brand, Smidt, Koning) und auch von uns festgestellten Tatsache, daß der Rahm einer Milch viel rascher entfärbt, als die Milch selbst, haben wir von einigen Milchproben zu einer Zeit, wo sie die Schardinger-Reaktion nicht gegeben haben, den Rahm durch Stehenlassen oder Zentrifugieren gewonnen und diesen mit einem entsprechenden Quantum der Formalin-Methylenblaulösung ver-

setzt. Wir haben regelmäßig eine mehr oder weniger vollkommene Entfärbung, gewöhnlich in verhältnismäßig kurzer Zeit erhalten (siehe Fall 4, 8, 11 und 13).

Wir können also das Schardinger-Enzym im Rahm gewissermaßen in konzentrierter Form erhalten. Dieselben Wahrnehmungen haben auch Koning und nach ihm wir bei Anwendung des fraktionierten Melkens gemacht. Bekanntlich besitzt die aus dem Euter zuerst ermolkene Milch (= Anfangsmilch) den geringsten Fettgehalt; dieser steigt während des Melkens (= Mittelmilch) an, und in der zuletzt ermolkenen Milch (= Restmilch) erhalten wir die fettreichste. Konings sowohl als unsere in dieser Richtung angestellten Untersuchungen haben gezeigt, daß Restmilch die Reaktion am raschesten, Mittelmilch langsamer und Anfangsmilch am spätesten liefert (siehe Fall 4, 6, 7, 8, 9, 12 und 13). Diesem Umstande ist wohl die Tatsache zuzuschreiben, daß Schern bei seinen Versuchen durchschnittlich rascheres Eintreten der Entfärbung erzielt hat; denn er hat, wie aus seiner Bemerkung auf S. 265 dieser Zeitschrift 18, 1909 hervorgeht, die Milch nach Beendigung des Abendmelkgeschäfts entnommen, hat also zu seinen Versuchen die fettreiche Restmilch verwendet.

Auf eine Differenz im Fettgehalt sind jedenfalls auch die Unterschiede in den Reaktionszeiten der morgens und der nachmittags 2 Uhr gewonnenen Milch des Falles 6 (siehe Untersuchung vom 28. VI. 1910) und des Falles 7 (siehe Untersuchung vom 28. VI. 1910) zu erklären: Die morgens entzogene Milch war fettarme Anfangsmilch, die nachmittags, kurze Zeit nach dem Saugen des Kalbes gewonnene war fettreiche Restmilch. Zwischen Morgen- und Abendmilch haben wir keinen wesentlichen Unterschied finden können.

Wie weitere, in den obigen Tabellen nicht enthaltene Untersuchungen, die wir zwecks Studiums des Verhältnisses zwischen Fettgehalt und Reaktionszeit angestellt haben, gezeigt haben, steht der Enzymgehalt einer Milch nicht in direktem Verhältnis zu ihrem Fettgehalt. Wie oben schon erwähnt, haben wir zum Teil sehr fettreiche Milchen untersucht, die nicht entfärbt haben. Bei einer Serie von Milchproben haben wir die Schardingersche Probe ausgeführt und gleichzeitig den Fettgehalt dieser Milchen nach der Gerberschen Sal-

methode ermittelt. Dabei konnte zuweilen beobachtet werden, daß Milch mit hohem Fettgehalt die Schardinger-Reaktion gar nicht oder sehr verspätet gab, während fettarme Milch die Reaktion prompt lieferte. Stets aber hat der Rahm rascher entfärbt als die zugehörige Milch oder vollends als die Magermilch. Aus diesen Versuchen dürfen wir den Schluß ziehen, daß das Schardinger-Enzym eine gewisse Affinität zu den Fettkügelchen der Kuhmilch besitzt, es geht in den Rahm über, wird in ihm angereichert, so daß wir es dort in konzentrierter Form antreffen und mit dem Rahm Entfärbung erzielen können, wo wir dies mit der Milch nicht erreicht haben; wenn wir einer Milch, die die Schardinger-Reaktion gibt, den Rahm entziehen, so entfärbt die Magermilch nicht mehr; das Enzym ist in den Rahm übergegangen.

Das Enzym ist aber kein integrierender Bestandteil der Fettkügelchen, wie Seligmann in der Zeitschr. f. Hygiene 58, 1 nach unserer Auffassung ganz richtig sagt, sondern es folgt ihnen wie den Caseinpartikelchen nur nach physikalischen Gesetzen. Wenn dem nicht so wäre, müßte ja jede fetthaltige Milch entfärben; und ferner müßte die Menge des Enzyms direkt proportional der Höhe des Fettgehaltes der betreffenden Milch sein; dies ist aber nicht der Fall, wie wir durch Untersuchungen von durch fraktioniertes Melken gewonnener Milch festgestellt haben. Wir haben den Fettgehalt der einzelnen Proben und parallel damit das Verhalten dieser dem Schardinger-Reagens gegenüber bestimmt. Wir haben keine volle Parallelität der Höhe des Fettgehalts mit der Schnelligkeit des Eintritts der Reaktion, d. h. mit der Menge des vorhandenen Enzyms finden können.

Wir haben oben erwähnt, daß das Schardinger-Enzym stets in der Milch, auch in der von frischmilchenden Kühen, wenn auch nur in Spuren, vorhanden ist, da in den betreffenden Milchen regelmäßig wenigstens eine mehr oder weniger deutliche Aufhellung zu Hellblau eintritt und da mit dem Rahm die Reaktion jederzeit zu erzielen ist. Daß tatsächlich das Schardinger-Enzym auch in der Milch „frischmilchender" Kühe vorhanden ist, haben wir auch noch durch drei weitere Versuche nachweisen können. Wir haben auf der einen Seite Milch, die sicher entfärbt hat, mit nicht entfärbender Colostral-

milch, und auf der andern Seite dieselbe Milch mit Wasser je in verschiedenen Verdünnungen vermischt. Über die nähere Anordnung der Versuchsreihen gibt nachstehende Übersicht Auskunft.

Mischung	Reaktionszeit		
	I	II	III
9 Teile Kuhmilch + 1 Teil Colostrum	19′	$4^1/_2$′	$6^1/_2$′
8 „ „ + 2 Teile „	24′	5′	$7^1/_2$′
7 „ „ + 3 „ „	27′	6′	$8^1/_3$′
6 „ „ + 4 „ „	34′	$6^1/_4$′	7′
5 „ „ + 5 „ „	48′	8′	9′
4 „ „ + 6 „ „	nach 60′ hellblau	10′	12′
3 „ „ + 7 „ „	> 60′	$11^1/_2$′	16′
2 „ „ + 8 „ „	> 60′	20′	38′
1 „ „ + 9 „ „	> 60′	nach 60′ Kuppe weiß	nach 60′ hellblau
0 „ „ + 10 „ „	> 60′	> 60′	> 60′

Mischung	Reaktionszeit		
	I	II	III
9 Teile Kuhmilch + 1 Teil Wasser	19′	$4^1/_2$′	$6^1/_2$′
8 „ „ + 2 Teile „	25′	5′	$7^1/_2$′
7 „ „ + 3 „ „	38′	6′	9′
6 „ „ + 4 „ „	nach 60′ hellblau	$6^1/_4$′	14′
5 „ „ + 5 „ „	> 60′	8′	nach 60′ hellblau
4 „ „ + 6 „ „	> 60′	13′	> 60′
3 „ „ + 7 „ „	> 60′	n. 60′ leichte Aufhellung	> 60′
2 „ „ + 8 „ „	> 60′	> 60′	> 60′
1 „ „ + 9 „ „	> 60′	> 60′	> 60′
10 „ „ + 0 „ „	13′	4′	6′

Vergleichen wir die Reaktionszeiten der Mischungen Milch + Colostrum der Serien I, II und III je mit den entsprechenden Serien der Mischungen Milch + Wasser, so sehen wir, daß bei den ersteren die Entfärbung rascher eingetreten ist als bei der mit Wasser verdünnten Milch; es muß also im ersteren Gemisch ein Körper vorhanden sein, der zur Entfärbung der F. M. beihilft, und das kann im vorliegenden Falle nur das in der Colostralmilch enthaltene Schardinger-Enzym sein. Die Unterschiede treten um so deutlicher hervor, je mehr Colostrum bzw. Wasser zugesetzt ist.

Bemerkenswert ist auch, daß, je mehr die frühzeitig (in 13, bzw. 4, bzw. 6 Minuten) entfärbende Milch mit Colostrum bzw. Wasser verdünnt ist, desto längere Zeit die Entfärbung in Anspruch nimmt. Ebenso wie man durch Zusatz von größeren Mengen der Formalin-Methylenblau-Lösung zu einer die Schardinger-Reaktion liefernden Milch das Enzym erschöpfen kann, ebenso kann man durch eine weitgehende Verdünnung dieser Milch mit Colostrum oder Wasser die Reaktion hinauszögern oder ganz aufheben. Zur Entfärbung eines gewissen Quantums der F. M.-Lösung braucht man eben ein entsprechendes Quantum Enzym.

Auf Grund der eben besprochenen Versuche dürfen wir wohl den Satz aufstellen, daß das Schardinger-Enzym in gesunder Milch stets, zuweilen (in Milch von „frischmilchenden" Kühen) allerdings nur in Spuren, vorhanden ist. Bezüglich des Fermentgehalts der Milch von „altmilchenden" und „frischmilchenden" Kühen bestehen demnach nur quantitative Unterschiede.

Gleichzeitig dürfen wir aus den obigen Versuchen schließen, daß in der Milch „frischmilchender" Kühe kein „Reduktasebekämpfer", kein „Antiferment" vorhanden ist; andernfalls müßte in „frischmilchender" Milch die Entfärbung unter allen Umständen ausbleiben, bzw. müßte Milch + Colostrum langsamer entfärben als dieselbe Milch + Wasser.

II. Milch von altmilchenden Kühen.

Wir haben oben schon erwähnt, daß Koning (l. c. S. 86) und Schern (l. c. S. 283) für frische Milch von gesunden, „altmilchenden" Kühen als Norm bezeichnet haben, daß 10 ccm solcher Milch bei Zusatz von 1 ccm F. M. im Wasserbad von 45° innerhalb längstens 12 Minuten entfärbt werden. Einerseits um die Richtigkeit dieser Angabe nachzuprüfen, andrerseits um gewissen Eigentümlichkeiten der Schardinger-Reaktion, auf die wir unten noch zu sprechen kommen werden, nachzugehen, haben wir auch eine Anzahl von Milchproben von nachweisbar altmilchenden, gesunden Kühen untersucht. Wir geben das Resultat eines Teiles dieser Untersuchungen in nachstehender Tabelle bekannt.

Tabelle II.

Nähere Bezeichnung	Letzte Geburt ist erfolgt vor Tagen:	Die Untersuchung der Milch wurde vorgenommen in ¼–1 Stunden nach Entnahme	3	5	7	22	24	Bemerkungen
		Die Reduktionszeit beträgt						
Kuh Nr. 95	112	6'	9'	10'	10'			
"	123	5'		6'	5½'	5'		
"	127	6½'		6½'	2½' [1]	5½'	1½' [1]	
Kuh Nr. 91	129	4½'	5'	5'	4½'			
"	140	4½'		5'	5'		4½'	
"	144	6'			5½'	5½'	2' [1]	
Kuh Nr. 94	117	5½'	7'	8'	7'			
"	128	5'		5½'	5½'	5'		
"	132	5'		5'	2½' [1]	4½'	2' [1]	
Kuh Nr. 116	82	11'			9'		9'	
"	86	13'		13'	12½'		12'	
"	93	9½' / 2½' [1]			9'	6½'	1¾' [1]	
Kuh Nr. 135	28	10'			10'		10'	Kalb saugt 28 Tage
"	33	15'		16'	17'	14'		
"	40	6' / 3½' [1]		6'	7'	5½'		
Kuh Nr. 110	96		5'		3½'		3½'	
"	100		5'		6'		5' / 1½' [1]	
"	105		5½' / 2½' [1]		7'		5' / 2½' [1]	
Kuh Nr. 109	100		6½'		5½'		4'	
"	104		5'		5'		4' / 1½' [1]	
"	109		7' / 2½' [1]	8'	6'		3' / 1½' [1]	
Kuh Nr. 76	200	7'			5½'		5'	
"	209	5' / 2½' [1]		6'	6'	3½'	1½' [1]	
"	222	6' / 2½' [1]		4'	5½'	6'		
Kuh Nr. 128	61	10'		7½'	7½'	6'		
"	70	13½' / — [2] [1]		20'	27'	12'	4' [1]	
"	79	8' / 4' [1]		9' / 5' [1]	9'		15' [3]	
Kuh Nr. 111	103	11½'		9'	10'	8'		
"	107	7'		8'	3' [1]	8'	3' [1]	
"	112	7½' / 3' [1]	10'	9½'		7'	3' [1]	

[1]) Bei 65°.
[2]) Nach 3 Stunden ist nur das untere Drittel entfärbt.
[3]) Milch geronnen.

Auf Grund vorstehender Untersuchungen können wir die Richtigkeit des eingangs dieses Abschnittes angeführten Satzes von Koning und Schern, im allgemeinen wenigstens, bestätigen. Nur bei Kuh Nr. 116, 2. Untersuchung, bei Kuh Nr. 135, 2. Untersuchung, und bei Kuh Nr. 128, 2. Untersuchung, haben sich geringe Abweichungen ergeben. Daß übrigens hie und da bei „altmilchenden“ Kühen zum Teil erhebliche Abweichungen von der Norm, Verzögerungen des Eintritts und selbst Ausbleiben der Reaktion vorkommen, haben wir schon oben auf S. 306 u. 307 bemerkt. Weiterhin sind wir im Laufe unserer Untersuchungen auf nicht wenige Milchen von nachweisbar „altmilchenden“, gesunden Kühen gestoßen, die die Schardinger-Reaktion nicht innerhalb der geforderten Zeit gegeben haben. Diese Abweichungen von dem oben als Norm angesprochenen Verhalten der Milch „altmilchender“ Kühe sind immerhin so zahlreich, daß wir hier besonders hervorheben möchten, daß die obige Behauptung Konings und Scherns nicht für alle Fälle und nicht unter allen Umständen zutrifft.

Ein Umstand allerdings ist dabei sehr zu beachten — und auf diesen können vielleicht manchmal Fälle der eben beschriebenen Art zurückgeführt werden — nämlich die Tatsache, daß der Zeitpunkt der Milchentnahme, d. h. die Länge der Zeit, die zwischen dem letzten Melken und der Probemilchentnahme verstrichen ist, von sehr wesentlichem Einfluß auf den Enzymgehalt der betreffenden Milch ist. Wir haben oben schon, wo wir das Verhältnis zwischen Fettgehalt und Enzymgehalt durch fraktioniertes Melken geprüft haben, feststellen können, daß Restmilch rascher entfärbt als Mittel- und Anfangsmilch. Wir haben diese Frage weiter verfolgt; wir haben zu diesem Zwecke zur üblichen Melkzeit (morgens und abends), nachdem also seit dem letzten Melken etwa 12 Stunden verflossen waren, den betreffenden Kühen zuerst 150 ccm Milch entnommen, hierauf das Euter bis auf etwa 200 ccm ausmelken lassen, diese letzten 200 ccm, ebenso wie die beiden ersten Proben, in einem besonderen Gefäß aufgefangen und nun jede Probe für sich auf ihren Enzymgehalt geprüft. Es hat sich dabei gezeigt, daß die ersten 150 ccm Milch das Reagens öfters nicht in der geforderten Zeit entfärbt haben, daß der Ablauf der Reaktion verzögert gewesen ist, während die beiden andern Proben die Reaktion

innerhalb 10 bis 12 Minuten gegeben haben. Die zuletzt gewonnenen 200 ccm entfärbten dabei regelmäßig früher als die mittlere und die erste Milchprobe.

Um sich vor Irrtümern zu bewahren, ist es deshalb notwendig, diese Verhältnisse zu berücksichtigen und bei der Milchentnahme sich darüber zu vergewissern, wann das letzte Melken stattgefunden hat. Denn wenn wir kurze Zeit nach dem üblichen Melken die Probe entnehmen, so erhalten wir die rasch und fast bei allen Kühen, auch bei den „frischmilchenden", entfärbende Restmilch; und wenn zwischen Melken und Probeentnahme lange Zeit verstrichen ist und wenn wir nur unsere Probe dem Euter entziehen, erhalten wir Anfangsmilch, die unter Umständen nur Spuren Enzym enthält und bei der in üblicher Weise angestellten Schardinger-Probe eine verzögerte Reaktion oder selbst ein negatives Resultat liefert, obwohl das Gesamtgemelke vielleicht entfärbt.

Auch darauf müssen wir hinweisen, daß die einzelnen Euterviertel einer und derselben Kuh — worauf übrigens auch schon Schern aufmerksam gemacht hat — Milch von verschiedenem Enzymgehalt liefern können; es ist deshalb, wenn nicht gerade aus besonderen Gründen die Milch eines einzelnen Viertels untersucht werden soll, angezeigt, die Mischmilch aus sämtlichen vier Vierteln zur Anstellung des Versuchs zu verwenden.

Auf was ist nun wohl die Tatsache zurückzuführen, daß in Restmilch mehr Enzym vorhanden ist als in Anfangsmilch? Mit dem höheren Fettgehalt der Restmilch ist der größere Enzymgehalt, wie wir oben schon ausgeführt haben, nicht in direkten Zusammenhang zu bringen. Das Saugen des Kalbes oder das Melken übt wohl einen funktionellen Reiz auf das Organ aus. Inwieweit aber mit der dadurch bewirkten Erhöhung der sekretorischen Tätigkeit der Drüsenzellen und der Steigerung der Stoffwechselvorgänge im Euter auch die Enzymproduktion beeinflußt wird, entzieht sich unserer Kenntnis.

Nach diesen Ausführungen dürfte es nunmehr an der Zeit sein, an die Beantwortung der Frage heranzugehen, wodurch die Entfärbung des F. M. herbeigeführt wird. Wir haben den die Entfärbung bewirkenden Körper bis jetzt als Schardinger-Enzym bezeichnet, ohne die Berechtigung hierzu näher zu begründen.

Schardinger selbst war geneigt, die Entfärbung des F. M. auf das Reduktionsvermögen von H_2S, der seiner Meinung nach immer in roher Milch vorhanden ist, zurückzuführen. Utz konnte jedoch H_2S in frischer Milch nicht nachweisen, und die von Koning in dieser Richtung angestellten Versuche sprechen ebenfalls gegen obige Annahme; letzterer hat nachgewiesen, daß Methylenblau weder durch Formalin, noch durch eine neutrale Formalin-Milchzuckerlösung, und ebensowenig durch H_2S, NaOH oder Kalkmilch entfärbt wird. Utz und Smidt wollten den Milchzucker als reduzierendes Agens beschuldigen, doch konnte nachgewiesen werden, daß Milchzucker nur in alkalischen Lösungen F. M. entfärbt, während doch letzteres auch durch neutral bzw. amphoter und sauer reagierende Milch entfärbt wird. Sommerfeld war der Ansicht, daß das Reduktionsvermögen der Milch gegenüber von F. M. bakterieller Herkunft ist, und Seligmann ist heute noch der entschiedenste Vertreter dieser Ansicht. Tatsächlich gibt es ja, wie Koning u. a. nachgewiesen haben, zahlreiche Bakterien, die in der Milch vorkommen und Stoffe produzieren, durch die F. M. entfärbt wird. Trommsdorff hat durch Versuche mit steriler Milch nachgewiesen, daß bei dieser die Entfärbung des F. M. ebenso rasch eintritt; er ist der Ansicht, daß die Entfärbung auf die Wirkung eines Enzyms zurückzuführen ist, das in der Milch präformiert ist.

Bei unseren zahlreichen Milchuntersuchungen hat sich gezeigt, daß die Schardinger-Reaktion bei Milch, die unmittelbar nach der Entnahme aus dem Euter untersucht worden ist, in vielen Fällen positiv ausfällt; in der kurzen Zeit zwischen Entnahme und Untersuchung konnte sich ein Einfluß von Bakterien nicht geltend machen, zumal da die ersten 4 bis 5 bakterienhaltigen Strahlen stets beiseite gemolken wurden und die Milch immer in sterilen Gläsern aufgefangen wurde. Wären Bakterien bei der Produktion des Schardinger-Enzyms in frischer Milch beteiligt, so müßten wir die Reaktion jederzeit auch in Milch von „frischmilchenden“ Kühen erhalten; denn diese ist ebenso bakterienhaltig wie andere. Ferner müßte Anfangsmilch rascher entfärben als Mittel- und Restmilch, denn die Anfangsmilch enthält die meisten Bakterien; die Milchproben verhalten sich aber gerade umgekehrt. Außerdem haben wir auch nicht wenige steril gewonnenen Milchproben untersucht und prompte positive Reaktionen erhalten.

Aus diesen Versuchen und Beobachtungen geht unbestreitbar hervor, daß der die Reaktion auslösende Körper ein Enzym ist und daß dieses in der Milch präformiert vorhanden ist. Derselben Ansicht sind auch Smidt, Brand,

Jensen, Oppenheimer, Trommsdorff, Koning und Schern. Die Produktion des Enzyms ist wohl als eine besondere Leistung der Euterdrüsenzellen anzusehen.

Daß es sich tatsächlich um ein Enzym oder um einen enzymartigen Körper handelt, geht daraus hervor, daß das wirksame Agens ähnliche Eigenschaften aufweist, wie wir sie den Enzymen als eigentümlich zusprechen. Es möge hier nur an die Empfindlichkeit gegenüber von Cyanwasserstoff, von konservierenden und desinfizierenden Substanzen, insbesondere auch von erheblicheren Zusätzen von Formalin, und ferner an das Verhalten gegenüber von höheren Temperaturen erinnert sein; in letzter Beziehung sei erwähnt, daß das Schardinger-Enzym bei Temperaturen von über 65° allmählich unwirksam und, wie Schardinger, Smidt, Rullmann[1]) und Koning nachgewiesen haben, bei Temperaturen von gegen 70° und darüber zerstört wird. Es empfiehlt sich daher, jedenfalls keine höheren Temperaturen als 65° anzuwenden.

Wir möchten hieran anschließend gleich eine Beobachtung mitteilen, die auch von Koning und Schern gemacht wurde, nämlich daß die optimale Temperatur für das Eintreten der Reaktion bei Milch von altmilchenden Kühen bei 65°, bei der von frischmilchenden Kühen bei 45° liegt. Wendet man die Temperaturen je umgekehrt an, so tritt eine Verzögerung der Entfärbung ein.

Auf eine schon bei der Untersuchung der Milch der „frischmilchenden" Kühe und nun auch bei der der Milch der „altmilchenden" Kühe beobachtete Erscheinung müssen wir aufmerksam machen. Aus Tabelle II und aus den weiter vorn abgedruckten Tabellen ist zu entnehmen, daß Milch unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Euter die Schardinger-Reaktion gibt, ja daß in einzelnen Fällen die unmittelbar nach ihrer Gewinnung untersuchte Milch etwas rascher entfärbt als ältere, die einige Stunden gestanden hat. Auch Schardinger, Utz, Trommsdorff und Koning konnten beobachten, daß Milch, die einige Stunden gestanden hat, nicht selten eine etwas längere Reaktionszeit in Anspruch nahm als ganz frische Milch. Wir konnten diese Erscheinung zuweilen nicht nur bei durch gewöhnliches Melken gewonnener, sondern auch bei steril ent-

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1904, 81.

nommener Milch wahrnehmen und weiterhin feststellen, daß die entfärbende Kraft der Milch etwa gegen die siebente Stunde nach Entnahme abnahm, um von da an wieder anzusteigen, so daß die Milch nach 24 Stunden meist rascher entfärbte als die unmittelbar nach der Gewinnung untersuchte Milch.

Die Ursache des zuweilen beobachteten anfänglichen Zurückgehens der entfärbenden Kraft der Milch konnten wir nicht eruieren. Von einer schädigenden Einwirkung von in der Milch enthaltenen Bakterien auf das Schardinger-Enzym kann nicht wohl die Rede sein, denn die gleiche Erscheinung konnten wir auch in einigen Fällen in steriler Milch beobachten. Daß die Erscheinung mit dem CO_2-Gehalt frischer Milch und mit dem Entweichen der Kohlensäure beim Stehen der Milch — wie Koning meint — in Zusammenhang zu bringen ist, müssen wir bezweifeln, insbesondere mit Rücksicht auf die Ergebnisse unserer Versuche mit steriler Milch auf S. 318, wo sich die Milch nach mehrstündigem Aufbewahren sogar etwas rascher entfärbt hat.

Wir haben oben erwähnt, daß die reduzierende Kraft der Milch Formalin-Methylenblau gegenüber etwa von der 7. Stunde nach der Entnahme an zunimmt, und müssen noch hinzufügen, daß die Milch von dieser Zeit an auch gewöhnliche alkoholische Methylenblaulösung zu entfärben imstande ist. Es hat sich also in dieser Zeit in der Milch ein Körper gebildet, der die Schardinger-Reaktion unterstützt und auch alkoholische Methylenblaulösung entfärbt. Zweifellos ist die Entstehung dieses Körpers auf Bakterien zurückzuführen. Denn gerade zu der oben erwähnten Zeit ungefähr pflegt die bactericide Phase der Milch abgelaufen zu sein, und es kommt nun zu einer massenhaften Vermehrung der in der Milch enthaltenen Bakterien.

Daß in der postbactericiden Phase der Milch tatsächlich die Bakterien es sind, die den reduzierenden Körper liefern, geht daraus hervor, daß pasteurisierte Milch, in der wohl das Schardinger-Enzym, aber nicht alle Sporen der Bakterien vernichtet sind, nach einiger Zeit die Fähigkeit, zu reduzieren, wieder annehmen kann; ferner auch daraus, daß die Reduktionskraft der Milch im allgemeinen mit zunehmender Bakterienzahl steigt, daß diese Fähigkeit durch Kochen verschwindet, aber nach Impfung der gekochten Milch mit geeigneten Bakterien oder mit bakterienhaltiger Milch wieder auftreten kann. Da

das Schardinger-Enzym selbst durch Erhitzen auf über 70° vernichtet wird, so können nur die Bakterien es sein, die der pasteurisierten bzw. gekochten Milch die Fähigkeit, zu entfärben, wieder verleihen.

In steril gewonnener und steril gehaltener Milch tritt eine Zunahme der Reduktionskraft nicht ein, wie wir durch folgende Versuche nachgewiesen haben: Wir haben in einer Anzahl steriler Erlenmeyer-Kölbchen unter aseptischen Kautelen gleichzeitig aus einem und demselben Euter Milch gewonnen und jeweils das erste Kölbchen sofort nach der Entnahme der Milch, das zweite nach 4stündigem, das dritte nach 7stündigem und das vierte nach 22stündigem Stehen auf die Reduktionsfähigkeit der betreffenden Milch untersucht. Gleichzeitig haben wir, um jedem Einwand vorzubeugen, bei den zwei ad hoc angestellten Versuchen von jeder einzelnen Milchprobe den Keimgehalt durch Plattenverfahren und Zählung bestimmt. Es sind zwei (I u. II) gesunde, sicher „altmilchende" Kühe zur Verwendung gekommen. Die Einzelheiten sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle III.

Kölbchen Nr.	Zeit der Untersuchung nach Entnahme	Reaktionszeit		Keime pro Kubikzentimeter Milch	
		I	II	I	II
1	sofort	17½′	6½′	46	0
2	nach 4 Std.	16′	6½′	12	0
3	nach 7 Std.	15′	7′	16	0
4	nach 22 Std.	17′	6½′	24	0

Wir ersehen aus obiger Tabelle, daß die Milch teils vollständig keimfrei war, teils nur wenige Bakterien enthielt, so wenige, daß sie unsern Versuch in keiner Weise beeinflussen konnten. Ein Vergleich der Reduktionszeiten der einzelnen Milchproben von Kuh I und II je unter sich zeigt, daß keine wesentlichen Zeitunterschiede bestehen und daß namentlich die Milchproben, die nach 22stündigem Stehen untersucht worden sind, sich nicht früher entfärbt haben als die sofort nach der Entnahme aus dem Euter untersuchten; ein Ansteigen der Reduktase und eine Beschleunigung der Entfärbung ist deshalb nicht eingetreten, weil eben keine oder nicht genügend viele Bakterien vorhanden gewesen sind, die reduzierende Substanzen hätten produzieren können.

Aus diesen Untersuchungen entnehmen wir, daß in der Milch zwei Körper vorhanden sein können, die dieselbe Eigenschaft, Formalin-Methylenblau zu entfärben, besitzen. Diese beiden Körper brauchen aber deswegen nicht identisch zu sein, sie üben wohl denselben Effekt aus, sind aber ihrem Wesen und ihrer Herkunft nach total verschieden: der eine ist ein in der Milch präformiertes, lösliches Enzym, ein spezifisches Produkt der Euterdrüsenzellen, steht mit der Bakterienflora der Milch in keinerlei Beziehung und entfärbt nur F. M.; der andere verdankt seine Entstehung Bakterien, ist ein Bakterienenzym, ein Ferment, an das Dasein lebenden Protoplasmas geknüpft und entfärbt außer F. M. gewöhnlich auch alkoholische Methylenblaulösung.

Aus vorstehenden Ausführungen ergeben sich folgende

Schlußfolgerungen.

I.

1. Das Thermodiaskop von Schern erleichtert die Ausführung der Schardingerschen Probe.

2. Das Abmessen der Flüssigkeiten mittels Pipetten ist der Benutzung der von Schern empfohlenen, graduierten Reagensgläschen, weil genauer, vorzuziehen.

3. Unmittelbar nach der Geburt und nicht selten auch noch in den nächstfolgenden Tagen gibt Kuhmilch (Colostralmilch) die Schardingersche Reaktion, wenn auch zuweilen verzögert.

4. In der Milch „frischmilchender" Kühe bleibt die Reaktion in der Regel aus und zeigt sich in den meisten Fällen erst nach Verlauf von 3 bis 8 Wochen post partum wieder.

5. Die Zeit des Wiedereintritts der Reaktion nach der Geburt ist großen Schwankungen unterworfen, deren Ursachen nicht immer feststellbar sind.

6. Das Saugen des Kalbes ist von keinem Einfluß auf die Zeit des Wiedereintritts der Reaktion nach der Geburt.

7. Allgemeinerkrankungen und Entzündungen des Euters beeinflussen die Schardinger-Reaktion.

8. Der Enzym- (Reduktase-) Gehalt der Milch ist nicht von dem Fettgehalt abhängig.

9. Das Schardinger-Enzym wird im Rahm und in der Restmilch angereichert angetroffen.

10. Das Enzym fehlt nie ganz, auch nicht in der Milch frischmilchender Kühe, was daraus hervorgeht, daß sich im Rahm bzw. in der Restmilch stets wenigstens Spuren des Enzyms nachweisen lassen und daß Mich + Colostralmilch rascher entfärbt als dieselbe Milch + Wasser.

11. In der Milch frischmilchender Kühe ist kein „Reduktasebekämpfer" (Antiferment) enthalten.

12. Zwischen dem Enzymgehalt „altmilchender" und „frischmilchender" Kühe bestehen nur quantitative Unterschiede.

13. Zur Entfärbung eines gewissen Quantums der F. M.-Lösung braucht man ein entsprechendes Quantum Reduktase.

II.

14. 10 ccm Milch von gesunden „altmilchenden" Kühen entfärben 1 ccm F. M. in der Regel innerhalb 4 bis 12 Minuten. Abweichungen von dieser Regel kommen öfters vor.

15. Die Zeit, die zwischen dem letzten Melken und der Entnahme einer Milch verflossen ist, ist von Einfluß auf den Enzymgehalt dieser Milch.

16. Beim fraktionierten Melken enthält die Anfangsmilch wenig, die Mittelmilch mehr und die Restmilch am meisten Reduktase.

17. Die einzelnen Euterviertel einer und derselben Kuh können Milch von verschiedenem Reduktasegehalt liefern.

18. Steril entnommene Milch entfärbt gerade so, wie die durch das übliche Melken gewonnene.

19. Der die Entfärbung bewirkende Körper ist ein in der Milch präformiert vorhandenes Enzym.

20. Temperaturen von über 65° machen das Enzym unwirksam.

21. Die optimale Reaktionstemperatur ist für Milch „altmilchender" Kühe bei 65°, für die „frischmilchender" Kühe bei 45°.

22. In bakterienhaltiger Milch tritt nach Ablauf der bactericiden Phase eine Zunahme der Reduktionskraft ein, in steriler Milch nicht. Die Zunahme ist auf fermentproduzierende Bakterien zurückzuführen.

Das Verhalten des Fettes tierischer Organe bei antiseptischer Aufbewahrung.

Von

Nagamichi Shibata.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 29. Januar 1911.)

Wenn von Tieren getrennte Gewebe oder Organe vor Fäulnis geschützt bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, so unterliegen dieselben dem Prozesse einer langsam verlaufenden Autolyse. Das mikroskopische Bild solcher Organe entspricht demjenigen bei der sogenannten fettigen Degeneration der Pathologen. Färbt man mikroskopische Präparate derselben mittels Flemmigscher Lösung oder Sudan III, so nehmen die gefärbten Fettkügelchen mit der Dauer der Autolyse bedeutend an Menge zu. Dieses Verhalten hat früher A. Sata[1]) eingehend verfolgt.

Sata hat frisch geschnittene Stücke von Leber, Niere und Herz von Menschen und getöteten Tieren (Meerschweinchen, Hunden und Katzen) teils einfach in Wasser gelegt, teils mit Sublimat — Carbolwasser oder Alkohol — gut gewaschen und dann möglichst steril aufbewahrt. Sowohl in den in Fäulnis begriffenen als auch in den bis zuletzt ganz steril gebliebenen Lebern und Nieren trat eine deutliche Vermehrung der gefärbten Fettkügelchen nach 5 Tagen auf und erreichte nach 25 Tagen

[1]) A. Sata, Über die postmortale Fettbildung der tierischen Gewebe. Mitteilungen der Med. Ges. zu Tokio 16, H. 19, 1902.

ihr Maximum. Hieraus glaubte Sata den Schluß ziehen zu dürfen, daß sich das Protoplasmaeiweiß der Organe nach dem Tode der Tiere z. T. in Fett umwandelt, und somit die alte Virchowsche Lehre von der Fettneubildung aus dem Protoplasmaeiweiß bei fettiger Degeneration innerer Organe von neuem bestätigt zu haben.

Diese Schlußfolgerung von Sata ist indessen durchaus nicht begründet; denn in tierischen Geweben und Organen kommen bekanntlich außer Neutralfett eine ganze Anzahl solcher Verbindungen vor, die im Molekül Fettsäureradikale enthalten, wie Lecithin, Jecorin, Protagon, Cerebrin, Seifen, Fettsäurecholesterinester usw. Die Zunahme der färbbaren Fettkügelchen im Laufe der Autolyse (gleichbedeutend mit der Dauer der antiseptischen Aufbewahrung der Organe) kann auf verschiedene Weisen zustande kommen, indem die anfänglich nicht sichtbaren Lipoide infolge der autolytischen Mazerationen sich in färbbare Formen umwandeln. Waldvogel behauptet, daß sich bei der Autolyse die Menge der übrigen Lipoide auf Kosten des „Lecithins" vermehre. Derselbe nimmt auch an, daß die Gesamtmenge des Fettes sich bei der Autolyse vermehrt.

Vor kurzem hat K. Ohta[1]) über dasselbe Thema eine Abhandlung publiziert und die vorliegenden Angaben kritisch erörtert. Ohta selbst gelangte bei seinen Untersuchungen zu dem Resultate, daß die Gesamtmenge der hochmolekularen Fettsäuren bei der Autolyse und antiseptischer Aufbewahrung der Leber weder zu- noch abnimmt, also ganz unverändert bleibt. Wie Ohta mit Recht hervorhebt, kann die wirkliche Fettneubildung aus anderen Verbindungen in den Organen nur dann mit voller Sicherheit als erwiesen erachtet werden, wenn in der Tat eine Vermehrung der Gesamtmenge hochmolekularer Fettsäuren sicher zu konstatieren wäre. Eine bloße Vermehrung des Ätherextrakts oder Alkohol- resp. Chloroformätherextrakts allein hat dagegen mit der wahren Fettvermehrung nichts zu tun. Da man leider bis vor kurzem Ätherextrakte allerlei Herkunft ganz einfach als „Fett" betrachtet hat, so war die Entwirrung der Fettbildungsfragen bis jetzt ganz unmöglich. Da Ohta in dieser Hinsicht mit der einwandfreien Fettbestimmungsmethode von Kumagawa-Suto gearbeitet hat und demgemäß gegen den von ihm gezogenen Schluß nichts einzuwenden ist, so habe ich doch dieses Thema von neuem

---

[1]) Über das Verhalten des Organfettes bei der Autolyse und antiseptischem Aufbewahren. Diese Zeitschr. 29, 1, 1910.

in Angriff genommen, weil zur definitiven Entscheidung einer biologisch so bedeutsamen Frage wie der Fettbildung aus Eiweiß im Tierkörper erneute Nachprüfungen doch wünschenswert erscheinen, um so mehr, da Ohta doch nur mit Pferdelebern sichere Resultate zu verzeichnen hatte.

Ohta hat durch zahlreiche Einzelbestimmungen von einem Pferdeleberbrei den Fetttgehalt während der Autolyse bis zu 30 Tagen verfolgt. Bei einer zweiten Pferdeleber hat Ohta in Parallelversuchen die Autolyse bei 37 bis 40° C unter antiseptischer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sogar 100 Tage beobachtet. Dabei betrug die Differenz des Leberfettes in den Einzelbestimmungen während 100 Tagen höchstens 3%. Die weitaus meisten Zahlen stimmten noch viel genauer überein. Dagegen haben die Autolysen einer Rindsherzmuskulatur, die 30 Tage lang untersucht worden war, wenig zufriedenstellende Resultate ergeben. Die Schwankungen der Fettzahlen betrugen hier um ± 10%. Ohta führt diesen Befund darauf zurück, daß die Mischung des Muskelbreis wegen der eigenartigen Struktur des Organs möglicherweise nicht ganz gleichmäßig gewesen sei. Ohta hat somit nur zwei Pferdelebern und ein Rinderherz untersucht, obwohl bei der zweiten Leber seine Beobachtungszeit sich auf 100 Tage ausdehnte.

Ich habe im folgenden 5 Lebern, 7 Nieren und 1 Oberschenkelmuskel von 2 Kaninchen, 1 Hund, 1 Katze und 5 Menschen untersucht. Im ganzen habe ich je 90 Fett- und Cholesterinbestimmungen ausgeführt. Ferner habe ich außer den Fettbestimmungen in jeder Serie mikroskopische Präparate mit Osmiumsäure und Sudan III gefärbt. Allerdings erstreckte sich meine längste Beobachtungszeit nur auf 46 Tage. Da Ohta in seinen Parallelversuchen gezeigt hat, daß der Fettgehalt sich bei Autolyse und antiseptischer Aufbewahrung ganz gleichmäßig verhielt, so habe ich in allen folgenden Versuchen antiseptische Aufbewahrung allein angewendet.

Versuchsanordnungen.

Frische, wasserhaltige Organe absolut keimfrei beliebig lange Zeit aufzubewahren, ist eine äußerst schwierige Aufgabe, wie dies auch Sata ganz besonders betonte. Sata konnte die mit Sublimat, Carbolwasser oder Alkohol gut ausgewaschenen Organe in seiner 25tägigen Versuchsdauer nur zweimal ganz steril erhalten. Gerade die Leber ist dasjenige Organ, das sich schwer keimfrei aufbewahren läßt.

Deshalb habe ich bei Leber und Nieren besondere Voroperationen angestellt. Diese Organe wurden im Zusammenhang mit möglichst langen Hauptgefäßen unversehrt aus den Körpern herausgenommen und bei den

Lebern von der Pfortader und bei den Nieren von den zuführenden Gefäßen aus mit sterilem Kochsalzwasser (1 $^0/_0$) unter gewissem Druck ausgespült, bis das Abflußwasser beinahe farblos herausfloß. Alsdann wurde das Spülwasser durch chloroformgesättigtes Kochsalzwasser ersetzt und die Ausspülung weiter fortgesetzt, bis die Flüssigkeit nunmehr ganz farblos abfloß. Von den so gereinigten Lebern wurden Stücke aus möglichst gefäßfreien Teilen herausgeschnitten.

Von den Nieren wurden Rindenteile nach Kapselabziehung herausgeschnitten. Dieselben wurden in die vorher tarierten kleinen Doppelschalen hineingebracht und gewogen. In jede Schale wurde vorher eine Schicht Gaze gelegt, die mit Chloroformwasser gut durchtränkt wurde. Nachdem je ein Organstück auf die Gaze aufgelegt und mitsamt dem Deckel abgewogen worden war, wurde eine passende Menge Kochsalzchloroformwasser darüber gegossen, so daß das Organstück ganz in die Flüssigkeit tauchte. Außerdem wurde noch ein ganz kleines Organstückchen extra hinzugelegt, das zur mikroskopischen Fettfärbung diente. Mehrere solcher mit Organstückchen beschickter, für sich geschlossene Schälchen sind nun in einer großen Petrischale, die im Boden etwas Chloroform enthält, geschlossen aufbewahrt worden, so daß alle Organstückchen dauernd in mit Chloroform gesättigtem Kochsalzwasser verweilten. Impfversuche auf Agarnährboden, die vor jeder Fettbestimmung angestellt worden sind, waren ein Zeugnis dafür, daß alle Proben ohne Ausnahme vollkommen steril blieben.

Alle Fettbestimmungen geschahen selbstverständlich nach der Verseifungsmethode von Kumagawa-Suto. Hierzu wurden Organstücke herausgenommen und im Becherglas genau nach der Vorschrift durch Laugenzusatz verseift. Anfänglich muß man bei der Verseifung die Mischung vorsichtig umrühren, bis das Chloroform vollkommen entwichen ist. Sonst tritt leicht unangenehmes Schäumen auf. Die untergelegte Gaze wurde für sich mit kochendem Alkohol vollkommen extrahiert und der Alkoholrückstand, sowie derjenige des Chloroformkochsalzwassers nach dem Verdunsten mit der Hauptmasse zusammen verseift.

Zur Fettfärbung habe ich Grüblersche Präparate von Osmiumsäure und Sudan III benutzt. Zur Auflösung von Sudan III wird in der Regel Alkohol vorgeschlagen. Um die fettlösende Wirkung desselben zu vermeiden, habe ich vergeblich versucht, durch Zusatz von Säure oder Alkali den Gehalt des Alkohols möglichst herabzusetzen. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die schwächste Konzentration desselben, die noch gute Fettfärbung bewirkt, 70 $^0/_0$ ig war. Deshalb habe ich bei meinen Untersuchungen diese Konzentration des Alkohols ohne Säureresp. Alkalizusatz beibehalten. Es ist kaum nötig zu erwähnen, daß alle erforderlichen Reagenzien, wie Alkohol, Äthyläther, Petroläther usw. vor dem Gebrauch durch Destillation gereinigt worden sind. Die Gaze wurde vorher durch gründliche Alkoholextraktion von Spuren von Lipoiden befreit. Alle sonstigen Einzeldaten sind in den Tabellen verzeichnet.

Tabelle Ia.

Material von Kaninchen I. — Körpergewicht 1,95 kg.
Untersuchung am 12. März 1910 begonnen.

1. Oberschenkelmuskel.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-	1	4,120		0,0297	0,7209	0,0217	0,5267	0,0080	0,1942
probe	2	9,068		0,0613	0,6761	0,0443	0,4926	0,0170	0,1875
Mittel		6,594		0,0455	0,6985	0,0330	0,5097	0,0125	0,1909
Eigentliche	1	5,447	7	0,0384	0,7049	0,0280	0,5158	0,0103	0,1891
Probe	2	5,505	7	0,0390	0,7084	0,0285	0,5177	0,0105	0,1907
Mittel		5,476	7	0,0387	0,7066	0,0283	0,5167	0,0104	0,1899
2. Leber.									
Kontroll-	1	4,342		0,0866	1,995	0,0694	1,598	0,0172	0,3961
probe	2	5,891		0,1164	1,976	0,0931	1,580	0,0233	0,3956
Mittel		5,117		0,1015	1,986	0,0813	1,589	0,0203	0,3959
Eigentliche	1	4,362	7	0,0860	1,972	0,0686	1,573	0,0174	0,3988
Probe	2	8,200	7	0,1624	1,981	0,1300	1,586	0,0324	0,3951
Mittel		6,281	7	0,1242	1,977	0,0993	1,573	0,0249	0,3970

Tabelle Ib.

Übersichtstabelle von Ia.

Die Zahlen sind Durchschnittswerte; prozentische Differenzen sind in Klammern angegeben.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Oberschenkelmuskel		0,6985 (100)	0,5097 (100)	0,1909 (100)
"	7	0,7103 (101,7)	0,5241 (102,8)	0,1892 (99,13)
Leber		1,986 (100)	1,589 (100)	0,3959 (100)
"	7	1,977 (99,56)	1,573 (98,97)	0,3970 (100,2)

Bei 7tägiger Aufbewahrung sind die prozentischen Differenzen der Petrolätherextrakte sowohl bei Muskel wie bei Leber unter 1 $^0/_0$ geblieben. Die Werte des Cholesterins stimmten bei der Leber und dem Muskel fast vollkommen überein.

Dagegen war die Menge der Fettsäuren beim Muskel um 2 % mehr und bei der Leber um 1 % weniger.

Tabelle IIa.

Material von Kaninchen II. Körpergewicht 2,77 kg.
Untersuchung am 26. März 1910 begonnen.

1. Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-	1	6,086		0,1698	2,790	0,1526	2,507	0,0172	0,2826
probe	2	2,904		0,0836	2,878	0,0738	2,540	0,0098	0,3375
Mittel		4,495		0,1267	2,835	0,1132	2,524	0,0135	0,3101
Eigentliche	1	7,581	6	0,2202	2,904	0,1970	2,598	0,0236	0,3060
Probe	2	8,890	6	0,2544	2,862	0,2248	2,529	0,0296	0,3330
Mittel		8,236	6	0,2373	2,883	0,2109	2,563	0,0266	0,3195
Eigentliche	1	7,230	12	0,2057	2,845	0,1776	2,470	0,0271	0,3749
Probe	2	6,390	12	0,1778	2,783	0,1578	2,470	0,0200	0,3130
Mittel		6,810	12	0,1917	2,814	0,1677	2,470	0,0264	0,3835
Eigentliche	1	6,904	15	0,1933	2,801	0,1694	2,462	0,0234	0,3491
Probe	2	6,128	15	0,1746	2,848	0,1548	2,525	0,0198	0,3390
Mittel		6,516	15	0,1840	2,825	0,1621	2,494	0,0216	0,3310
2. Linke Niere.									
Kontroll-	1	3,603		0,0936	2,598	0,0736	2,043	0,0200	0,5550
probe	2	—		—	—	—	—	—	—
Mittel		3,603		0,0936	2,598	0,0736	2,043	0,0200	0,5550
Eigentliche	1	3,730	42	0,0962	2,579	0,0752	2,016	0,0210	0,5630
Probe	2	—	—	—	—	—	—	—	—
Mittel		3,730	42	0,0962	2,579	0,0752	2,016	0,0210	0,5630

Tabelle IIb.

Übersichtstabelle von IIa.
Die Zahlen sind Durchschnittswerte; prozentische Differenzen sind in Klammern angegeben.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,835 (100)	2,524 (100)	0,3101 (100)
„	6	2,833 (101,7)	2,563 (101,5)	0,3191 (102,9)
„	12	2,814 (99,24)	2,470 (97,86)	0,3835 (123,7)

Tabelle IIb (Fortsetzung).

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber	15	2,825 (99,63)	2,494 (98,81)	0,3310 (100,3)
Linke Niere		2,598 (100)	2,043 (100)	0,5550 (100)
„ „	42	2,579 (99,15)	2,016 (98,70)	0,5630 (101,4)

Die Petrolätherextrakte stimmen bei Leber in allen Serien mit Kontrollproben sehr gut überein. Die Fettsäuren differieren um einige Prozente. Einer der sonst sehr gut übereinstimmenden Cholesterinwerte hat dagegen eine Abweichung von $+24\,\%$ gezeigt. Bei der Niere haben alle Werte in 42 Tagen eine Differenz von $\pm 1\,\%$ erwiesen.

Tabelle IIIa.

Material von einem Hund von 6 kg Körpergewicht.

Untersuchung am 4. April 1910 begonnen.

1. Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-	1	14,130		0,3828	2,710	0,3300	2,336	0,0528	0,3737
probe	2	18,396		0,4824	2,622	0,4210	2,288	0,0614	0,3337
Mittel		16,263		0,4326	2,666	0,3755	2,312	0,0571	0,3537
Eigentliche	1	18,02	20	0,4806	2,667	0,4198	2,330	0,0608	0,3374
Probe	2	13,75	20	0,3740	2,720	0,3282	2,388	0,0458	0,3322
Mittel		15,88	20	0,4273	2,694	0,3740	2,359	0,0533	0,3348
Eigentliche	1	10,360	26	0,2842	2,744	0,2482	2,397	0,0360	0,3475
Probe	2	17,892	26	0,4700	2,638	0,2691	2,296	0,0612	0,3422
Mittel		14,126	26	0,3771	2,691	0,2389	2,346	0,0486	0,3449
Eigentliche	1	8,901	34	0,2450	2,753	0,2110	2,371	0,0340	0,3820
Probe	2	18,823	34	0,4898	2,602	0,4261	2,2263	0,0637	0,3384
Mittel		13,862	34	0,3674	2,678	0,3186	2,3590	0,0489	0,3602
Eigentliche	1	18,45	46	0,4820	2,612	0,4180	1,999	0,0640	0,3469
Probe	2	17,339	46	0,4690	2,705	0,4130	2,365	0,0590	0,3403
Mittel		18,193	46	0,4755	2,668	0,4116	2,324	0,0615	0,3436

Tabelle IIIa (Fortsetzung).

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
2. Rechte Niere.									
Kontroll-	1	9,657		0,2746	2,844	0,2278	2,359	0,0468	0,4846
probe	2	8,276		0,2296	2,774	0,1904	2,300	0,0392	0,4737
Mittel		8,967		0,2521	2,809	0,2091	2,330	0,0430	0,4786
Eigentliche	1	8,1940	45	0,2268	2,768	0,1878	2,292	0,0390	0,4760
Probe	2	9,5134	45	0,2678	2,815	0,2242	2,357	0,0436	0,4583
Mittel		8,8537	45	0,2473	2,792	0,2060	2,325	0,0413	0,4672
3. Linke Niere.									
Kontroll-	1	9,718		0,2685	2,755	0,2245	2,302	0,0440	0,4528
probe	2	9,070		0,2572	2,835	0,2152	2,372	0,0420	0,4630
Mittel		9,394		0,2629	2,795	0,2199	2,337	0,0430	0,4579
Eigentliche	1	10,351	45	0,2882	2,785	0,2400	2,319	0,0482	0,4657
Probe	2	8,927	45	0,2530	0,834	0,2070	0,375	0,0460	0,4593
Mittel		9,639	45	0,2705	2,810	0,2235	2,347	0,0471	0,4625

Tabelle IIIb.

Übersichtstabelle von IIIa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,666 (100)	2,312 (100)	0,3537 (100)
„	20	2,694 (101,3)	2,359 (102,1)	0,3348 (94,62)
„	26	2,691 (100,9)	2,346 (101,5)	0,3449 (97,36)
„	34	2,678 (100,4)	2,319 (100,03)	0,3602 (102,0)
„	46	2,668 (100,1)	2,324 (100,9)	0,3436 (99,4)
Rechte Niere		2,809 (100)	2,330 (100)	0,4786 (100)
„ „	45	2,792 (99,38)	2,325 (102)	0,4672 (97,72)
Linke Niere		2,795 (100)	2,337 (100)	0,4579 (100)
„ „	45	2,810 (100,6)	2,347 (100,5)	0,4625 (101,0)

Die Petrolätherextrakte und Fettsäuren stimmen sowohl bei Leber wie bei Nieren sehr gut überein. Die Cholesterinwerte differieren meist um einige Prozente.

Tabelle IVa.

Material von einer Katze von 3,11 kg Körpergewicht.

Untersuchung am 26. April 1910 begonnen.

Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontrollprobe	1	15,911		0,4290	2,697	0,3528	2,218	0,0762	0,4789
	2	11,152		0,2940	2,637	0,2453	2,200	0,0487	0,4368
Mittel		13,53		0,3615	2,667	0,2990	2,209	0,0629	0,4580
Eigentliche Probe	1	15,664	16	0,4370	2,790	0,3622	2,312	0,0748	0,4776
	2	14,253	16	0,3786	2,657	0,3118	2,188	0,0668	0,4688
Mittel		14,959	16	0,4078	2,724	0,3370	2,250	0,0768	0,4732
Eigentliche Probe	1	7,794	28	0,2080	2,675	0,1649	2,267	0,0318	0,4081
	2	9,575	28	0,2576	2,690	0,2128	2,222	0,0448	0,4679
Mittel		8,645	28	0,2353	2,721	0,1960	2,267	0,0393	0,4545

Tabelle IV b.

Übersichtstabelle von IVa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organes	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,667 (100)	2,209 (100)	0,4580 (100)
"	16	2,724 (102,1)	2,250 (101,81)	0,4732 (103,3)
"	28	2,721 (102,1)	2,267 (102,7)	0,4545 (99,83)

Alle drei Werte stimmen sehr gut überein. Nur die Cholesterinwerte differieren immer noch um einige Prozente.

Tabelle Va.

Material von einer 42jährigen Frau. Todesursache Placenta praevia. Untersuchung am 12. Mai 1910 begonnen.

Linke Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontrollprobe	1	6,979		0,1148	1,644	0,0833	1,192	0,3315	0,4513
	2	6,774		0,1164	1,718	0,0865	1,101	0,0299	0,4414
Mittel		6,872		0,1156	1,681	0,0839	1,147	0,3307	0,4469
Eigentliche Probe	1	5,114	7	0,0846	1,655	0,0626	1,244	0,0220	0,4302
	2	5,821	7	0,0954	1,639	0,0665	1,194	0,0279	0,4449
Mittel		5,468	7	0,0900	1,647	0,0646	1,220	0,0250	0,4464
Eigentliche Probe	1	5,118	14	0,0848	1,657	0,0610	1,192	0,0238	0,4650
	2	4,540	14	0,0767	1,690	0,0569	1,254	0,0198	0,4361
Mittel		4,829	14	0,0808	1,674	0,0590	1,223	0,0218	0,4376
Eigentliche Probe	1	4,244	20	0,0745	0,756	0,0557	1,313	0,0188	0,4430
	2	5,523	20	0,0899	1,629	0,0737	1,184	0,0246	0,4454
Mittel		4,884	20	0,0822	1,693	0,0649	1,249	0,0212	0,4442

Tabelle Vb.

Übersichtstabelle von Va.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Linke Niere		1,681 (100)	1,147 (100)	0,4469 (100)
" "	7	1,647 (97,95)	1,220 (106,3)	0,4464 (99,88)
" "	14	1,6740 (99,59)	1,223 (106,4)	0,4376 (99,97)
" "	20	1,693 (100,7)	1,249 (108,9)	0,4442 (99,4)

Die Petrolätherextraktwerte stimmen sehr gut überein. Dagegen zeigen die hochmolekularen Fettsäurenwerte eine weniger gute Übereinstimmung.

Tabelle VIa.

Material von einem 44jährigen Manne. Todesursache: akute Peritonitis. Untersuchung am 12. Mai 1910 begonnen.

Rechte Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-probe	1	7,099		0,1224	1,724	0,0928	1,307	0,0296	0,4171
	2	8,905		0,1470	1,651	0,1112	1,249	0,0358	0,4021
Mittel		8,025		0,1347	1,688	0,1020	1,278	0,0327	0,4096
Eigentliche Probe	1	7,325	7	0,1236	1,688	0,0396	1,278	0,0300	0,4096
	2	5,659	7	0,0954	1,686	0,0720	1,273	0,0234	0,4135
Mittel		6,492	7	0,1095	1,687	0,0553	1,276	0,0267	0,4116
Eigentliche Probe	1	6,009	18	0,1000	1,663	0,0756	1,257	0,0244	0,4061
	2	5,252	18	0,0880	1,675	0,0666	1,268	0,0214	0,4074
Mittel		5,631	18	0,0940	1,669	0,0711	1,263	0,0229	0,4068
Eigentliche Probe	1	7,375	24	0,1246	1,696	0,0946	1,289	0,0300	0,4067
	2	7,465	24	0,1302	1,744	0,0996	1,334	0,0306	0,4100
Mittel		7,420	24	0,1274	1,720	0,0971	1,312	0,0303	0,4084
Eigentliche Probe	1	7,909	31	0,1328	1,679	0,1004	1,268	0,0324	0,4222
	2	5,659	31	0,0956	1,690	0,0720	1,273	0,0236	0,4171
Mittel		6,784	31	0,1142	1,685	0,0862	1,271	0,0280	0,4197

Tabelle VIb.

Übersichtstabelle von VIa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Rechte Niere		1,688 (100)	1,278 (100)	0,4096 (100)
„ „	7	1,687 (99,33)	1,276 (99,84)	0,4116 (100,5)
„ „	18	1,669 (98,81)	1,263 (98,81)	0,4068 (99,33)
„ „	24	1,720 (101,9)	1,312 (102,8)	0,4084 (99,77)
„ „	31	1,685 (99,82)	1,271 (99,42)	0,4197 (103,8)

Alle drei Werte stimmen mit wenigen Ausnahmen ziemlich gut.

Tabelle VIIa.

Material von einem 14jährigen Knaben. Todesursache Pleuritis.
Untersuchung am 18. Mai 1910 begonnen.
Rechte Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-	1	8,523		0,1512	1,774	0,1088	1,277	0,0424	0,4975
probe	2	8,442		0,1490	1,765	0,1074	1,272	0,0416	0,4928
Mittel		8,483		0,1501	1,770	0,1081	1,275	0,0420	0,4952
Eigentliche	1	9,571	8	0,1688	1,764	0,1224	1,279	0,0464	0,4849
Probe	2	8,036	8	0,1428	1,777	0,1032	1,284	0,0396	0,4928
Mittel		8,803	8	0,1558	1,771	0,1128	1,282	0,0430	0,4889
Eigentliche	1	8,467	14	0,1501	1,772	0,1083	1,278	0,0418	0,4937
Probe	2	7,153	14	0,1268	1,773	0,0914	1,278	0,0354	0,4949
Mittel		7,810	14	0,1385	1,773	0,0999	1,278	0,0386	0,4943
Eigentliche	1	6,921	21	0,1226	1,771	0,0884	1,277	0,0342	0,4941
Probe	2	5,798	21	0,1026	1,769	0,0740	1,276	0,0286	0,4933
Mittel		6,360	21	0,1126	1,770	0,0812	1,278	0,0314	0,4937
Eigentliche	1	6,556	29	0,1166	1,779	0,0838	1,285	0,0328	0,5003
Probe	2	4,566	29	0,0806	1,765	0,0586	1,283	0,0220	0,4817
Mittel		5,561	29	0,0986	1,772	0,0712	1,284	0,0274	0,4910

Tabelle VIIb.

Übersichtstabelle von VIIa.
Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Rechte Niere		1,770 (100)	1,275 (100)	0,4952 (100)
" "	8	1,771 (100)	1,282 (100,6)	0,4889 (98,72)
" "	14	1,773 (100,2)	1,278 (100,2)	0,4943 (99,82)
" "	21	1,770 (100)	1,278 (100,2)	0,4937 (99,68)
" "	29	1,772 (100,1)	1,284 (100,7)	0,4910 (99,15)

Fast vollständige Übereinstimmung aller drei Werte.

Tabelle VIIIa.

Material von einem 60 jährigen Manne. Todesursache Herzfehler.

Untersuchung am 18. Mai begonnen.

Linke Niere.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petroläther-extraktes g	%	Menge der hochmolekularen Fettsäuren g	%	Menge des Cholesterins g	%
Kontroll-	1	10,401		0,1600	1,538	0,1165	1,120	0,0435	0,4183
probe	2	7,732		0,1176	1,522	0,0847	1,097	0,0320	0,4255
Mittel		9,072		0,1388	**1,530**	0,1006	**1,109**	0,0382	**0,4219**
Eigentliche	1	8,128	8	0,1245	1,531	0,0897	1,103	0,0348	0,4282
Probe	2	9,372	8	0,1445	1,542	0,1047	1,117	0,0398	0,4247
Mittel		8,750	8	0,1345	**1,537**	0,0972	**1,110**	0,0378	**0,4264**
Eigentliche	1	8,131	14	0,1254	1,542	0,0904	1,112	0,0350	0,4304
Probe	2	8,852	14	0,1360	1,537	0,0990	1,119	0,0370	0,4180
Mittel		8,750	14	0,1307	**1,540**	0,0947	**1,116**	0,0360	**0,4242**
Eigentliche	1	13,963	21	0,2142	1,534	0,1536	1,096	0,0606	0,4341
Probe	2	3,574	21	0,0552	1,544	0,0399	1,116	0,0153	0,4281
Mittel		8,769	21	0,1347	**1,539**	0,0968	**1,106**	0,0379	**0,4311**

Tabelle VIIIb.

Übersichtstabelle von VIIIa.

Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petroläther-extraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Linke Niere		**1,530** (100)	**1,109** (100)	**0,4219** (100)
„ „	8	**1,537** (100,5)	**1,110** (100,1)	**0,4264** (101,0)
„ „	14	**1,540** (100,7)	**1,116** (100,7)	**0,4242** (100,6)
„ „	21	**1,539** (100,6)	**1,106** (99,52)	**0,4311** (102,2)

Sehr gute Übereinstimmung aller drei Werte.

Tabelle IXa.

Material von einem 19jährigen Mädchen. Todesursache: Appendicitis.
Untersuchung am 21. Juni begonnen.

Leber.

Art der Proben	Probe Nr.	Menge des Organstückes	Tage der Aufbewahrung	Menge des gereinigten Petrolätherextraktes		Menge der hochmolekularen Fettsäuren		Menge des Cholesterins	
				g	%	g	%	g	%
Kontroll-	1	10,59		0,3112	2,939	0,2692	2,542	0,0420	0,3966
probe	2	12,79		0,3748	2,930	0,3242	2,534	0,0506	0,3957
Mittel		16,69		0,3330	2,935	0,2967	2,538	0,0463	0,3962
Eigentliche	1	5,838	6	0,1718	2,943	0,1482	2,535	0,0232	0,3974
Probe	2	16,031	6	0,4698	2,931	0,4062	2,534	0,0636	0,3968
Mittel		10,935	6	0,3205	2,937	0,2772	2,535	0,0434	0,3971
Eigentliche	1	14,17	13	0,4176	2,947	0,3620	2,555	0,0556	0,3924
Probe	2	15,72	13	0,4608	2,931	0,3944	2,534	0,0624	0,3968
Mittel		14,94	13	0,4287	2,939	0,3782	2,545	0,0590	0,3946
Eigentliche	1	11,72	16	0,3420	2,917	0,2952	2,518	0,0468	0,3992
Probe	2	14,62	16	0,4302	2,943	0,3720	2,545	0,0582	0,3980
Mittel		13,17	16	0,3861	2,930	0,3336	2,532	0,0525	0,3986
Eigentliche	1	11,33	29	0,3342	2,949	0,2896	2,555	0,0446	0,3937
Probe	2	8,114	29	0,2372	2,932	0,2050	2,535	0,0322	0,3969
Mittel		9,722	29	0,2857	2,940	0,2473	2,545	0,0384	0,3953
Eigentliche	1	11,82	37	0,3470	2,935	0,3002	2,540	0,0468	0,3959
Probe	2	12,30	37	0,3620	2,943	0,3133	2,547	0,0487	0,3959
Mittel		12,06	37	0,3545	2,938	0,3068	2,544	0,0478	0,3959

Tabelle IXb.

Übersichtstabelle von IXa.
Durchschnittswerte und prozentische Differenzen.

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber		2,935 (100)	2,538 (100)	0,3962 (100)
"	6	2,937 (100,1)	2,535 (99,88)	0,3971 (100,2)
"	13	2,939 (100,1)	2,545 (100,2)	0,3946 (99,61)
"	16	2,930 (99,84)	2,532 (99,74)	0,3986 (100,7)

Tabelle IXb (Fortsetzung).

Namen des Organs	Tage der Aufbewahrung	Menge des Petrolätherextraktes %	Menge der hochmolekularen Fettsäuren %	Menge des Cholesterins %
Leber	29	240,9 (100,2)	2,545 (100,2)	0,3953 (99,77)
„	37	2,938 (100,1)	2,544 (100,2)	0,3959 (99,97)

Eine fast vollständige Übereinstimmung aller drei Werte.

Schlußbetrachtung.

Wie die einzelnen Daten in den Tabellen ausführlich zeigen, stimmten die Werte der im ganzen je 90 Einzelbestimmungen von Petrolätherextrakten und hochmolekularen Fettsäuren sowohl bei Lebern, Nieren und Muskeln von Menschen und Tieren sehr gut überein, wenn man von einigen stark abweichenden Zahlen absieht. Dagegen stimmten die Werte für Cholesterin anfänglich nicht gut miteinander. Aber in den späteren, besonders die Menschenorgane betreffenden Untersuchungen, stimmten alle drei Werte fast vollkommen überein. Die einzelnen Organe sind nachgewiesenermaßen in absolut sterilem Zustande 7 bis 46 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden (in der Sommerperiode stieg die Zimmertemperatur manchmal auf 32° C). Dabei zeigte die Menge der hochmolekularen Fettsäuren und wohl auch die des Cholesterins keine Veränderung. Demnach ist der von Ohta bei der Pferdeleber festgestellte Befund von mir auch bei anderen Tieren und anderen Organen von neuem festgestellt worden. Somit bleibt das Gesamtquantum der hochmolekularen Fettsäuren selbst bei langdauernder Autolyse der inneren Organe bei Zimmertemperatur ganz unverändert. Es findet keine Fettneubildung aus Eiweiß bei der mit der fettigen Degeneration als identisch anzusehenden Autolyse statt, wie es manche Pathologen jetzt noch glauben. Der Befund, daß die mikroskopisch färbbaren Fettkügelchen mit der Dauer des Aufbewahrens in der Regel deutlich zunehmen, kann, wie eingangs erwähnt, nur so gedeutet werden, daß die anfänglich in komplizierten Molekülen eingelagerten Fettsäureradikale mit der Dauer der Autolyse allmählich von ihnen losgelöst werden und sich dabei in leicht sichtbare Modifikationen umwandeln.

Über das Verhalten des Calciums im Serum und über den Gehalt der Blutkörperchen an Calcium.

Von

P. Rona und D. Takahashi.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 30. Januar 1911.)

I.

Obgleich die Frage, in welcher Form sich das Calcium im Blute bzw. im Plasma befindet, eine der ältesten der physiologisch-chemischen Forschung ist, besitzen wir nur spärliche experimentelle Untersuchungen über diesen Gegenstand.[1]) Vor langer Zeit ausgeführte Bestimmungen von Pribram[2]), nach denen die Kalkwerte, nach direkter Fällung des Serums mit Ammoniumoxalat gewonnen, mit den nach dem Veraschen erhältlichen übereinstimmen sollen, haben keine genügende Beweiskraft für die Annahme, daß der Kalk nur in ionisierter Form im Serum vorhanden ist, da, wie Gerlach und Drechsel[3]) nachgewiesen haben, die Zahlen von Pribram infolge Verunreinigung seines Niederschlages durch Magnesiumammoniumphosphat zu hoch ausfallen mußten. Wenn auch die Annahme einer Eiweiß-Kalkverbindung im Serum wiederholt

---

[1]) Vgl. die Literatur hierüber bei Fr. Hofmeister, Ergebnisse d. Physiol. 10, 429, 1910.

[2]) R. Pribram, Ber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, 23, 279, 1871.

[3]) L. Gerlach, Ber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, 24, 349, 1872.

von verschiedenen Forschern gemacht worden ist, fehlte für das Vorhandensein eines nicht ionisierten Kalkalbuminats daselbst bis jetzt der experimentelle Beweis; wir stellten uns daher die Aufgabe, dieses Problem einer Prüfung zu unterziehen.

Zu diesem Zwecke benutzten wir die Methode der „Kompensationsdialyse"[1]), bei der die Verschiebung eines vorhandenen Gleichgewichtes nach Möglichkeit vermieden wird, im Gegensatz zu der gewöhnlichen Dialyse und den verschiedenen Filtrationsmethoden.[2]) Wir dialysierten in Reihenversuchen gegen eine isotonische Kochsalzlösung, die Calcium in ionisierter Form, als $CaCl_2$, in verschiedener Konzentration enthielt. Aus dem Gleichbleiben des Calciumgehaltes in einer Probe,[3]) aus der Zu- oder Abnahme desselben in anderen, ließ sich ein Rückschluß auf die diffusible Menge des Calciums im Serum machen und nach der direkten Bestimmung des gesamten Calciums nach Veraschen des Serums der diffusible Anteil desselben ermitteln.

Stets wurden 70 ccm Serum von verschiedenen Tierarten (Pferd, Rind, Schwein) gegen 50 ccm physiologische Kochsalzlösung mit vorher genau festgestelltem Calciumgehalt dialysiert. Die Calciumbestimmung erfolgte wie üblich nach trockener Ver-

---

[1]) Vgl. Zuntz und Loewy, Pflügers Archiv 58, 511, 1894; Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 14, 476, 1908: 21, 114, 1909; P. Rona, ebenda 29, 501, 1910.

[2]) Von neueren Arbeiten über diffusible Bestandteile des Blutserums vgl. namentlich L. Asher, diese Zeitschr. 14, 1, 1908, ferner R. Burian, Pflügers Arch. 136, 741, 1910.

[3]) Da wir mit isotonischen und nicht mit isosmotischen Lösungen arbeiten, wäre es theoretisch denkbar, daß anfangs vorübergehend auch in jenen Fällen, in denen die diffusible Calciummenge in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich ist, das Calcium entgegen seinem natürlichen Gleichgewicht eine minimale Verschiebung erfährt. Auf die Einstellung des Calciumgleichgewichtes innerhalb und außerhalb der Membran würde diese Verschiebung, auch wenn sie stattfinden sollte, nicht den geringsten Einfluß ausüben: schließlich muß in allen Fällen die Menge des diffusiblen Calciums in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich werden, und in den Fällen, in denen die Werte desselben von vornherein in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich oder nahezu gleich waren, werden sie auch nach Abschluß der Dialyse unverändert bleiben oder sich nur wenig ändern.

aschung durch Fällung mit Ammoniumoxalat und Wägung als CaO. Um jede Verunreinigung mit Magnesium auszuschließen, folgten wir bei der Fällung des Calciums streng den Vorschriften von Richards[1]). Die Bestimmung des Calciums in Form von $CaSO_4$ durch Fällung mit Alkohol in schwefelsaurer Lösung ist in calciumarmen und alkalireichen Flüssigkeiten nicht zu empfehlen.[2])

Die einzelnen Versuche verliefen wie folgt:

I. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in %; g		
	sofort	nach 20 Stunden	nach 40 Stunden
I.	0,0133	0,0123	0,0114
II.	0,0091	0,0107	0,0099
III.	0,0045	0,0081	0,0085

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in %: 0,0169 g.

Betrachten wir die vorliegenden Befunde, so zeigt es sich, daß der Kalkgehalt in der Außenflüssigkeit I ab-, der in III zugenommen hat, während der in II nur unbedeutend zunahm, fast gleich geblieben ist. Wir werden demnach den Wert an „diffusiblem" CaO zwischen den Werten 0,0133% und 0,0091% annehmen müssen.

Eine genauere Berechnung läßt sich folgendermaßen ausführen. Werden A Teile gegen B Teile Außenflüssigkeit dialysiert und ist der %-Gehalt der Außenflüssigkeit an CaO vor der Dialyse a, nach Abschluß der Dialyse b, so ergibt sich die Menge des diffusiblen CaO im Serum[3]) in % nach der Gleichung

$$\frac{b(A+B)-aB}{A}$$

Auf diese Weise finden wir für den diffusiblen Kalk in I 0,0115 bzw. 0,0100%, in II 0,0118 bzw. 0,0105%, in III 0,0106 bzw. 0,0114%.

[1]) Th. W. Richards, Ch. Mc Caffrey und H. Bisbee, Zeitschr. f. anorgan. Chem. 28, 71, 1901.

[2]) Vgl. hierzu H. Aron in Abderhaldens Handbuch der Biochem. Arbeitsmethoden 1, 407, 1910.

[3]) Unter der Voraussetzung, daß das Gleichgewicht zwischen diffusiblem und nicht diffusiblem Calcium im Serum während der Dialyse nicht oder nur ganz unbedeutend gestört wird; eine Bedingung, die bei unserer Versuchsanordnung zutrifft.

als Mittel 0,0110°/₀. Angesichts der äußerst niedrigen analytisch ermittelten absoluten Zahlen ist die Übereinstimmung der berechneten Werte wohl befriedigend. Jedenfalls zeigt der Versuch, daß die Methode nicht nur den Sinn der Änderung im Calciumgehalt der Außenflüssigkeit richtig wiedergibt, sondern auch in guter Annäherung die Menge des diffusiblen Calciums festzustellen gestattet. Daß bei den niedrigen absoluten Zahlen die prozentischen Werte mit einem relativ großen Fehler behaftet sind, ist natürlich; der Größenordnung nach wird aber der Wert für das diffusible Calcium zweifellos richtig angegeben. — Die direkte Bestimmung im Serum ergab 0,0169°/₀ CaO. Also, obgleich diese CaO-Menge gegen eine von 0,0133°/₀ dialysiert hat, nahm letztere während der Dialyse ab und nicht, wie man erwartet hätte, zu! — Von den 0,0169 g Kalk waren nach obiger Feststellung 0,0110 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 65°/₀ diffusibel, 35°/₀ nicht diffusibel.

II. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in °/₀; g		
	sofort	nach 14 Stunden	nach 20 Stunden
I.	0,0133	0,0119	0,0111
II.	0,0091	0,0110	0,109
III.	0,0045	0,0084	0,0084

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in °/₀: 1. 0,0173, 2. 0,0169.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III stark zu, in II nur ganz wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0112°/₀. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0171 g CaO. Davon sind 0,0112 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 65,5°/₀ diffusibel, 34,5°/₀ nicht diffusibel.

III. Pferdeserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in °/₀; g		
	sofort	nach 18 Stunden	nach 24 Stunden
I.	0,0133	0,0109	0,0115
II.	0,0079	0,0100	0,0103
III.	0,0049	0,0090	0,0081

CaO-Gehalt des Pferdeplasmas in °/₀: 1. 0,0173, 2. 0,0175.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III stark, in II ein wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0115°/₀. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0174 g CaO. Davon sind 0,0115 g diffusibel, 0,0059 g nicht diffusibel, d. h. 66°/₀ diffusibel, 34°/₀ nicht diffusibel.

IV. Schweineserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in $^0/_0$; g		
	sofort	nach 24 Stunden	nach 59 Stunden
I.	0,0157	0,0120	0,0110
II.	0,0082	0,0090	0,0085
III.	0,0036	0,0085	0,0082

CaO-Gehalt des Schweineplasmas in $^0/_0$: 0,0130.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III zu, in II nur ganz wenig zu. Für den diffusiblen Kalk berechnet sich aus diesen Daten der Wert 0,0097 $^0/_0$. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0130 g CaO. Davon sind 0,0097 g diffusibel, 0,0033 g nicht diffusibel, d. h. 75 $^0/_0$ diffusibel, 25 $^0/_0$ nicht diffusibel.

V. Schweineserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in $^0/_0$; g	
	sofort	nach 48 Stunden
I.	0,0155	0,0122 0,0122
II.	0,0087	0,0087 0,0083
III.	0,0033	0,0086 0,0081

CaO-Gehalt des Schweineserums in $^0/_0$: 0,0138.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III zu, in II blieb er (fast) unverändert. Die Menge des diffusiblen Kalkes wird also diesem Werte nahe entsprechen. Gefunden wurde nach Veraschung im Serum in 100 g 0,0138 g CaO. Davon sind 0,0087 g diffusibel, 0,0051 g nicht diffusibel, d. h. 63 $^0/_0$ diffusibel, 37 $^0/_0$ nicht diffusibel.

VI. Rinderserum.

	CaO-Gehalt in der Außenflüssigkeit in $^0/_0$; g	
	sofort	nach 64 Stunden
I.	0,0166	0,0122
II.	0,0082	0,0096
III.	0,0040	0,0080

CaO-Gehalt des Rinderplasmas in $^0/_0$: 0,00130.

Der Kalkgehalt nahm in I ab, in III bedeutend zu, in II viel weniger zu. Für den diffusiblen Kalk berechnen sich aus diesen Daten 0,0102 $^0/_0$. Gefunden wurden nach Veraschung des Serums in 100 g 0,0130 g CaO. Davon sind 0,0102 g diffusibel, 0,0028 g nicht diffusibel, d. h. 78 $^0/_0$ diffusibel, 22 $^0/_0$ nicht diffusibel.

Aus der Gesamtheit dieser Versuche geht unzweifelhaft hervor, daß eine nennenswerte Menge des Calciums (etwa 25 bis 35%) im Serum in nicht diffusibler Form vorhanden ist. Spezielle Angaben über diese nicht diffusible Form gibt der Versuch zunächst nicht. Vor allem auf Grund der neueren Untersuchungen von Pauli und Samec[1]) werden wir jedoch hier wohl eine Bindung des Ca an die Serumeiweißkörper annehmen müssen. Auf die biologische Bedeutung dieser Tatsache, namentlich hinsichtlich des Transportes unlöslicher oder schwer löslicher Kalksalze sei hier nur kurz hingewiesen.

II.

Vor einiger Zeit wies Hamburger[2]) auf die Tatsache hin, daß entgegen der bisherigen Anschauung die Blutkörperchen, speziell die des Rindes, Calcium enthalten. Da wir die Absicht hatten, die Verteilung des Calciums im Blute unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, mußten wir zunächst eine Anzahl Bestimmungen über den Calciumgehalt der Blutkörperchen einiger Tierarten (Rind, Schwein, Pferd, Hammel, Hund) unter normalen Ernährungsbedingungen ausführen, um eine Grundlage für die späteren Untersuchungen zu besitzen. Die Bestimmung des Calciumgehaltes der Blutkörperchen erfolgte in einer Reihe von Versuchen indirekt, so, daß wir den Calciumgehalt des Gesamtblutes und des Serums genau ermittelten, dann mittels eines Hedinschen Hämatokriten von sehr hoher (10000) Tourenzahl die prozentische Verteilung der Blutkörperchen und des Serums bestimmten. Aus den so gewonnenen Daten läßt sich dann der Calciumgehalt der Blutkörperchen berechnen. — In einer Anzahl Fälle stellten wir den Calciumgehalt der Blutkörperchen auch direkt fest. In diesen Versuchen wurde das Blut in einer elektrisch getriebenen Zentrifuge (mit ca. 4000 Touren in der Minute) 30 Minuten zentrifugiert, dann das Serum möglichst genau mit der oberflächlichen Blutkörperchenschicht zusammen abgehoben, danach der Blutkörperchenbrei noch 3 bis 4 mal

---

[1]) Pauli und Samec. Diese Zeitschr. 17, 235, 1909.

[2]) H. J. Hamburger, Zeitschr. f. physikal. Chem. 69, 663, 1910; ferner Hamburger und Bubanovic, Arch. intern. de phys. 10, 1, 1910; vgl. hierzu aber Gryns, Konigl. Akad. van Wetensch. Amsterdam 19, 475. Nach Chem. Centralbl. 2, 1486, 1910.

je ca. 30 Minuten zentrifugiert, wobei jedesmal die oberflächliche Serumschicht sehr sorgfältig entfernt wurde.

Die gewonnenen Resultate sind in den folgenden Tabellen niedergelegt.

I. Rind.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
1	45	55	0,0087 0,0087	0,0133 0,0127	0,0034
2	44	56	0,0089 0,0091	0,0130 0,0130	0,0039
3	42	58	0,0089 0,0087	0,0131 0,0131	0,0028
4	48	52	0,0080 0,0078	0,0135 0,0135	0,0019

II. Schwein.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
5	46	54	0,0095 0,0091	0,0129 0,0135	0,0047
6	47	53	0,0090 0,0092	0,0138	0,0038
7	48	52	0,0088 0,0083	0,0128 0,0132	0,0038
8	50	50	0,0080 0,0082	0,0130 0,0134	0,0030

III. Pferd.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
9	43	57	0,0107 0,0105	0,0173 0,0175	0,0016
10	43	57	0,0110 0,0110	0,0167 0,0171	0,0032
11	47	53	0,0109 0,0101	0,0173 0,0169	0,0029
12	44	56	0,0107 0,0107	0,0167 0,0169	0,0030

IV. Hammel.

	Hämatokrit-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
13	50	50	0,0089	0,0157	0,0020
14	52	48	0,0086	0,0143	0,0022
15	42	58	0,0091	0,0141	0,0029
16	46	54	0,0091	0,0165	0,0041

V. Hund.

	Hämatokrit.-Best. %		CaO-Gehalt in Gew.-%; g		
	Blutkörp.	Serum	Blut	Serum	Blutkörperchen (berechnet)
17	37	63	0,0111	0,0161	0,0025
18	25	75	0,0125	0,0157	0,0030

Die direkten Bestimmungen des CaO in den Blutkörperchen gaben folgende Resultate in Gew.-%.

19. Hammel 0,0027 (indirekt 0,0020)
20. Hammel 0,0032 (indirekt 0,0029)
21. Hammel 0,0034
22. Hund 0,0024 (indirekt 0,0025)
23. Pferd 0,0022
24. Pferd 0,0030
25. Rind 0,0036
26. Rind 0,0040
27. Schwein 0,0030
28. Schwein 0,0031

Es ergibt sich demnach sowohl auf indirektem, wie auch auf direktem Wege in Übereinstimmung mit dem Befunde von Hamburger, daß die Blutkörperchen der untersuchten Tierarten Calcium, wenn auch in sehr geringer Menge (etwa 0,0025 bis 0,0035%) enthalten. Weder die indirekte noch die direkte Bestimmung ist frei von Fehlerquellen. Die Hämatokritzahlen sind jedoch durch wiederholte Bestimmungen möglichst genau auf ihre Richtigkeit kontrolliert worden, so daß man berechtigt war, sie als Grundlage für die Berechnung der Ca-Werte in den Blutkörperchen zu benutzen. Und auch die den Blut-

körperchen etwa noch beigemengten Spuren Serum können bei der direkten Bestimmung der abzentrifugierten Blutkörperchen die erhaltenen Werte kaum nennenswert verschieben. Selbst wenn wir die sicher nicht zutreffende, übertriebene Annahme machen, die Blutkörperchen enthielten noch 5% Serum, wären die gefundenen Werte nicht erklärt. Wir glauben demnach annehmen zu können, daß die gefundenen Ca-Zahlen außerhalb des Bereichs der Fehlergrenzen der angewandten Methoden liegen. Wie die Untersuchungen Hamburgers[1]) zeigen, wird das Calcium beim Waschen der roten Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung aus den Blutkörperchen entfernt; daraus wird erklärlich, daß die von früheren Forschern an sorgfältig gewaschenen Blutkörperchen angestellten Untersuchungen das Calcium vermissen ließen. Was die Genauigkeit der von uns gefundenen Zahlen anlangt, muß darauf hingewiesen werden, daß sich bei den äußerst niedrigen absoluten Zahlen die analytischen Fehler bereits sehr bemerkbar machen müssen. Unter diesen Umständen müssen wir die Übereinstimmung der Werte der direkten und der indirekten Bestimmung als recht befriedigend ansehen.

[1]) l. c.

Über Ester- und Fettspaltung im Blute und im Serum.

Von

Peter Rona und Leonor Michaelis.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses am Urban in Berlin.)

(Eingegangen am 9. Februar 1911.)

Mit 23 Figuren im Text.

Die zahlreichen Untersuchungen über Fett- und Esterspaltung im Blute und in den Geweben führten bis jetzt zu widerspruchsvollen Resultaten.[1]) Infolge fehlerhafter Ausführung der zur Feststellung einer stattgehabten Spaltung angewandten Methodik — Titration der entstandenen Säure — sind die Befunde einer Reihe von Forschern, wie dies Saxl kritisch beleuchtet hat[2]), nicht zu verwerten. Aber auch bei Innehaltung der nötigen Kautelen ist ein auf dem Nachweis der gebildeten Säure begründetes Verfahren zu einer eindeutigen Feststellung der vorliegenden Verhältnisse wenig geeignet. Saxl kam daher auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß „keine der bisher empfohlenen Methoden ein quantitatives Studium der Esterspaltung gestattet, da die gewonnenen Werte entweder bei kurzer Versuchsdauer so gering sind, daß sie kaum außerhalb der Fehlergrenze liegen, oder aber (bei langer Versuchsdauer) durch die mit den Bestimmungsmethoden verbundenen Fehlerquellen getrübt werden". Sollte demnach einem Fortschritt in der Erforschung dieses Problems der Weg geebnet werden, so mußte eine Methode zur Verwendung kommen, die auf einwandfreiere Weise die Esterspaltung festzustellen

[1]) Vgl. die Literatur hierüber bei Connstein, Ergeb. d. Physiol. 3, 194, 1904 und C. Oppenheimer, Die Fermente, 3. Aufl., 1909.

[2]) Saxl, Diese Zeitschr. 12, 343, 1908.

befähigt ist und auch gestattet, in den Gang der Spaltung einen genauen Einblick zu erhalten.

Selbstverständlich wird jede Eigenschaft, die den zu spaltenden Körper den Spaltprodukten gegenüber auszeichnet, dazu dienen können, ein Verschwinden des gespaltenen Körpers bzw. das Auftreten seiner Spaltprodukte nachzuweisen, wenn nur der Nachweis einer Änderung des ursprünglichen Verhaltens im Verlaufe des fermentativen Prozesses eindeutig auf diesen bezogen werden kann. Wir besitzen nun in der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen der Ester im Vergleiche zu der ihrer Spaltprodukte ein Charakteristikum von ganz hervorragender Schärfe. Während z. B. die Glycerinester zu den sehr „oberflächenaktiven" Stoffen gehören — Stoffe, die die Spannung des reinen Lösungsmittels schon in sehr geringer Konzentration stark erniedrigen — ändern die entstehenden Spaltprodukte, die entsprechenden Salze der (niederen) Fettsäuren und das Glycerin die Oberflächenspannung nur ganz unbedeutend. Stellt man also die Oberflächenspannung einer gesättigten Monobutyrinlösung nach der Tropfenmethode fest, indem man die Tropfen zählt, die bei dem Entleeren eines gewissen Volumens der Flüssigkeit aus einer Capillarröhre gebildet werden, so wird man nach einer mehr oder weniger langdauernden Alkaliwirkung finden, daß die Oberflächenspannung den Wert des reinen Wassers (fast) erreicht hat. So wurde bei einer gesättigten wässerigen Monobutyrinlösung in einem Capillarröhrchen (bei 18°) die Tropfenzahl 170 gefunden. Wurde diese Lösung mit Natronlauge zu $^1/_{10}$ n versetzt und kurz aufgekocht, so sank die Tropfenzahl gleich auf 109, nach etwa 1 Stunde auf 98, während die Tropfenzahl in derselben Capillarröhre für reines Wasser 97 betrug. (Alles bei 18° gemessen.) Bei schwächeren Alkalikonzentrationen und niedrigeren Temperaturen verlief die Spaltung durch das Alkali entsprechend langsamer, wie dies durch die langsamere Abnahme der Tropfenzahl auf bequeme Weise nachgewiesen werden konnte. Somit hätten wir in der Feststellung der Oberflächenspannungsänderung einen empfindlichen Indikator für den Nachweis einer stattgehabten Spaltung und ein Mittel, den Gang der Spaltung während des Prozesses zu verfolgen. Die Änderung der Oberflächenspannung als Maß für den Verlauf

physiologisch-chemischer Prozesse wurde schon von **Traube** in mehreren Arbeiten, wie auch von **Ascoli** und **Izar** in verschiedenen Untersuchungen benutzt.

Sollte diese Methode für den Nachweis einer Esterspaltung im Blute bzw. Serum anwendbar sein, so mußte sie folgende Bedingungen erfüllen. Das Monobutyrin durfte zunächst durch Wasser allein in den bei den Versuchen angewandten Temperaturen und in den in Betracht kommenden Zeiten keine Spaltung erleiden. Dies ist auch der Fall. Wurde die gesättigte wässerige Monobutyrinlösung mit verschiedenen Mengen Wasser versetzt, so erhielt man folgende Kurve (Fig. 1).

Monobutyrin (18°).

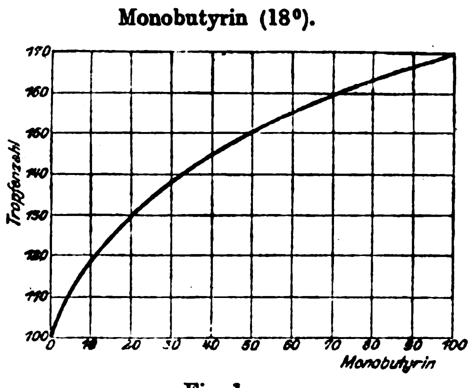


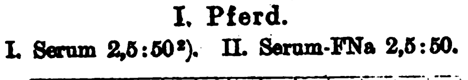
Fig. 1.

Die Abszisse gibt die Konzentration der Lösung an Monobutyrin an, wobei mit 100 die gesättigte wässerige Lösung bezeichnet ist, während die Ordinate die „Tropfenzahl" der zugehörigen Monobutyrinlösung bei 18° angibt. Die Kurve hat die bekannte Gestalt der „Oberflächenspannungs-Konzentrationskurve": die Oberflächenspannungserniedrigung ist bei niedriger Konzentration des Monobutyrins relativ größer als bei höherer. — Worauf es hier ankommt, ist, daß dieselben Werte der Tropfenzahl (bei derselben Temperatur) auch bei längerem — mehrtägigem — Aufbewahren der betreffenden Lösungen unverändert erhalten werden. Ferner durfte die Alkalität des Blutes, d. h. die dort herrschende $OH^{\cdot}$-Ionen-Konzentration, keine hydrolytische Wirkung auf den Ester ausüben. Zu diesem Zwecke versetzten wir die Esterlösung mit einem Phosphatgemisch (zu ca. $^1/_{30}$ n) von einer $H^{\cdot}$-Ionen-Konzentration, die der des Blutes entspricht ($0{,}35 \cdot 10^{-7}$). Selbst nach Tagen war bei 18° keine Änderung der ursprünglich gefundenen Oberflächenspannung zu konstatieren. — Daß auch die Eiweißkörper oder sonstige Serumbestandteile keine Spaltung, die an einer Änderung der Tropfenzahl nachweisbar wäre, veranlassen, beweisen die

unten angeführten Versuche, die die Wirkungslosigkeit des aufgekochten (oder mit FNa versetzten) Serums zeigen.[1])

Auf Grund dieser Vorversuche konnten wir also eine durch Blut oder Serum bedingte Änderung der Oberflächenspannung der Monobutyrinlösungen auf eine fermentative Spaltung des Monobutyrins beziehen.

Die diesbezüglichen Untersuchungen sind in den folgenden Kurven (Fig. 2 bis 12) niedergelegt. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Tropfenzahl bei 18° an.



I. Pferd.
I. Serum 2,5:50[2]). II. Serum-FNa 2,5:50.

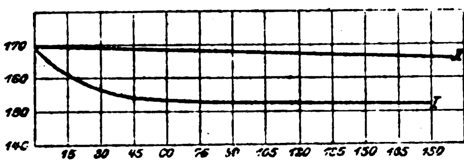


Fig. 2.

II. Kaninchen.
I. Serum 2,5:50.



Fig. 3.

III. Kaninchen.
I. Serum 2,5:50.

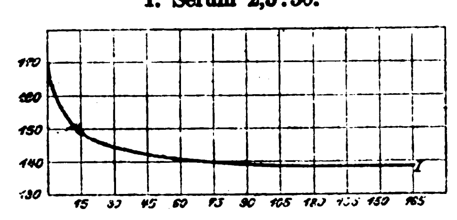
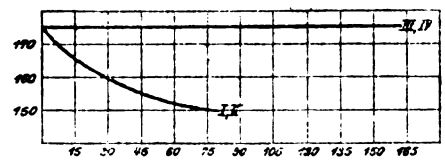


Fig. 4.

IV. Kaninchen.
I. Serum 1:50. II. Blut 1:50.
III. Serum (aufgekocht) 1:50.
IV. Serum-FNa 1:50.





V. Rind.
Serum 1:50. Serum 2:50.

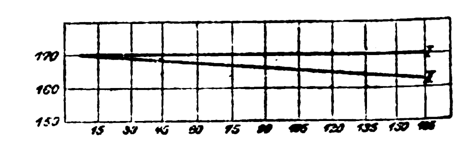




Fig. 5. Fig. 6.

[1]) Das Serum resp. Blut übt, wie bereits Traube für die genuinen Eiweißkörper gefunden hat, nur einen äußerst geringen Einfluß auf die Oberflächenspannung des Wassers aus.

[2]) Serum 2,5:50 bedeutet 2,5 ccm Serum + Monobutyrin gesättigte Lösung auf 50 ccm usw.

VI. Rind.

I. Blut 1:50. II. Serum 1:50. III. Serum-FNa 5:50. IV. Serum 5:50.

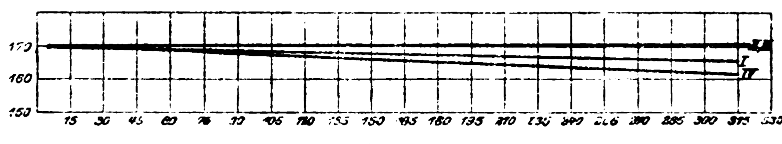
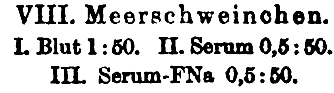


Fig. 7.

VII. Hund.

I. Blut 1:50. II. Blut 4:50. III. Serum 1:50. IV. Serum-FNa 4:50. V. Serum 4:50.

VIII. Meerschweinchen.



I. Blut 1:50. II. Serum 0,5:50. III. Serum-FNa 0,5:50.

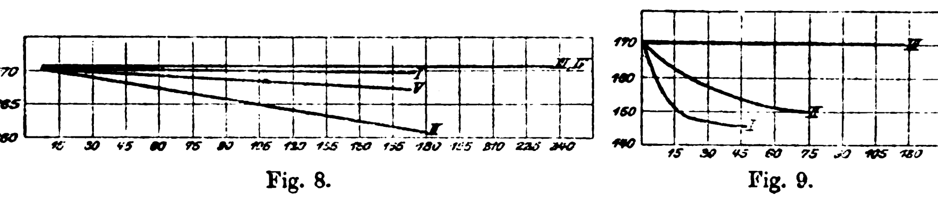


Fig. 8. Fig. 9.

IX. Meerschweinchen.

I. Serum 1:50.

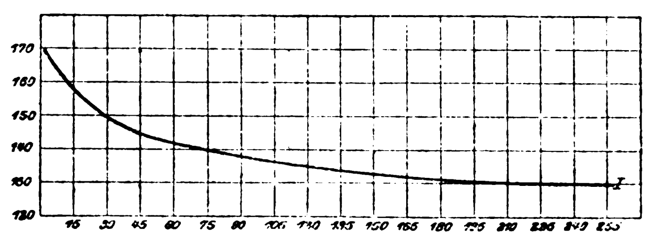


Fig. 10.

X. Kaninchen.

I. Kaninchenserum 0,5:50. II. Serum auf 70° erwärmt 0,5:50. III. Serum aufgekocht 0,5:50.

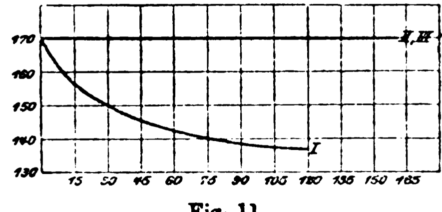


Fig. 11.

XI. Hammel.

I. Blut 1:50. II. Blut 4:50. III. Serum 1:50. IV. Serum 4:50. V. Serum-FNa 4:50.

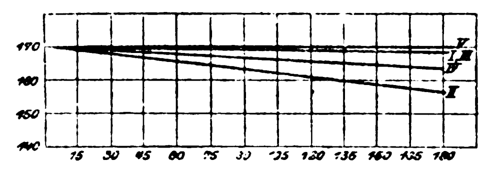


Fig. 12.

Methodisch wäre zu den Kurven zu bemerken, daß alle in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen im Wasserbade von 18° durchgeführt worden sind. Während der Untersuchung schwankte die Temperatur höchstens um ±0,5°; da die Zu- oder Abnahme der Tropfenzahl mit der Zu- oder Abnahme der Temperatur um 1° in diesem Temperaturbereich etwa 2 beträgt, so kann der durch diese geringe Schwankung der Temperatur bedingte Fehler vernachlässigt werden. — Der Fehler in der Bestimmung der Tropfenzahl beträgt ±1 Tropfen. Da die beobachteten Differenzen 20 bis 50, oft bis 70 Tropfen betragen, kann die Beobachtung als genau bezeichnet werden. Dazu kommt, daß bereits die äußerst geringen Änderungen von 2 bis 3 Tropfen verwendet werden können, da sie im Vergleich mit dem vorherigen und dem nach einer gewissen Zeit aufgenommenen Befund ein zuverlässiges Bild über das Fortschreiten oder Stillstehen des Prozesses geben.

Aus den Kurven ist nun ersichtlich, daß in allen untersuchten Tierarten die Gegenwart eines Monobutyrin spaltenden Fermentes im Serum bzw. Blut angenommen werden muß. Besonders stark wirksam ist das Ferment bei Meerschweinchen und Kaninchen; schon nach wenigen Minuten tritt eine energische Spaltung ein, die von einem gewissen Punkt an einer sehr allmählichen Hydrolyse Platz macht. Die Spaltungsprodukte, namentlich die freiwerdende Säure, übt, wie dies schon Hanriot gefunden hat, einen hemmenden Einfluß auf den Verlauf der fermentativen Wirkung[1]). Serum und Blut erwiesen sich bei diesen Tierarten als gleich wirksam. — Viel schwächer war die

[1]) Es muß auch darauf hingewiesen werden, daß die entstandene Buttersäure — sofern sie nicht von den Kationen des Blutes resp. Serums in Beschlag genommen wird und so als fettsaures Salz so gut wie keine Wirkung auf die Oberflächenspannung ausübt — die Oberflächenspannung stark erniedrigt und ein Fortschreiten des fermentativen Prozesses nicht klar erkennen läßt. Bei quantitativer Untersuchung der Hydrolyse wird es sich demnach empfehlen, künftighin die Lösung mit einem Phosphatgemisch als Reaktionsregulator zu versehen, das das Auftreten von freier Säure verhindern soll. — Ein Stillstand des Prozesses könnte auch durch ein echtes Gleichgewicht zwischen dem Ester und seinen Spaltprodukten veranlaßt werden. Bis jetzt ist es uns jedoch nicht gelungen, eine Rückbildung des Butyrats aus seinen Spaltprodukten unter dem Einfluß des Fermentes experimentell nachzuweisen.

Wirkung der „Monobutyrase“ bei Pferd, Hammel, Rind, Hund, und bei all diesen übertrifft die Wirksamkeit des Blutes die des Serums um das mehrfache. Das vorherige Aufkochen des Serums hebt die spaltende Wirkung auf, Zusatz von FNa hemmt sie sehr bedeutend.

Wie sich andere Tierarten und der Mensch in bezug auf die Esterspaltung verhalten und ob durch verschiedene Eingriffe, namentlich durch die Ernährung, der Fermentgehalt des Blutes beeinflußbar ist, werden weitere von uns in Angriff genommene Untersuchungen lehren.

II. Die vorangehende Untersuchung stellt in Übereinstimmung mit Hanriot in einer Anzahl Blut- und Serumarten die Gegenwart eines das Monobutyrin spaltenden Fermentes fest. Auf dieselbe Weise konnte nun weiterhin ein das Tributyrinspaltendes Ferment, also eine echte Lipase im Blut und Serum nachgewiesen werden.

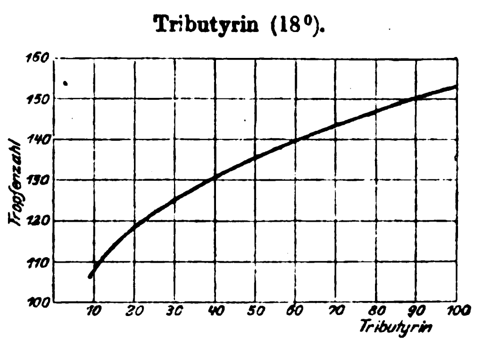


Fig. 13.

Trotz der äußerst geringen Löslichkeit des Tributyrins in Wasser genügen die gelösten Spuren, um die Oberflächenspannung des Wassers sehr stark zu erniedrigen. So zeigte eine Capillarröhre für reines Wasser die Tropfenzahl 97 (18°), für eine gesättigte Tributyrinlösung 154. Die Änderung der Oberflächenspannung einer wässerigen Tributyrinlösung für wechselnde Konzentration an Tributyrin zeigt die Kurve (Fig. 13), wobei mit 100 die gesättigte Tributyrinlösung bezeichnet ist.

Auch hier konnte festgestellt werden, daß das Wasser in den in Frage kommenden Temperaturgebieten und Zeiträumen keine Spaltung veranlaßt und daß die im Blut herrschende OH'-Ionenkonzentration selbst nach Tagen bei 18° keine Spaltung bewirkt.

Den Verlauf der einzelnen Versuche zeigen die folgenden Kurven (Fig. 14 bis 23). Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, die Ordinate die Tropfenzahl bei 18° an.

XII. Rind.

I. Blut 1:25. II. Serum 0,5:25. III. Serum 2:25. IV. Serum-FNa 2:25.[1]

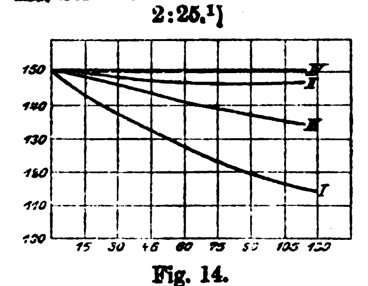


Fig. 14.

XIII. Rind.

(Dasselbe Blut wie in XII., einen Tag später.)

I. Blut 1:25. II. Serum 1:25.

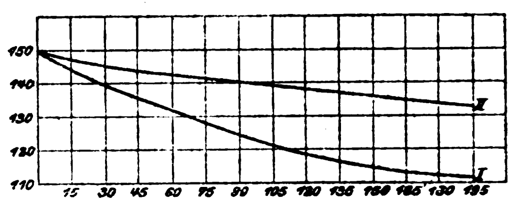


Fig. 15.

XIV. Rind.

I. Blut 0,2:25. II. Serum 0,2:25. III. Blut 1:25. IV. Serum 1:25.

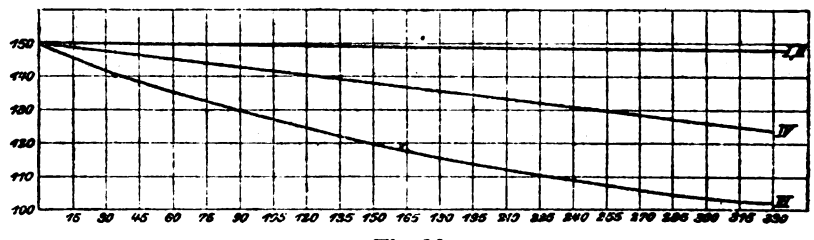


Fig. 16.

XV. Schwein.

I. Blut 1:25. II. Blut 2:25. III. Serum 1:25. IV. Serum 2:25.

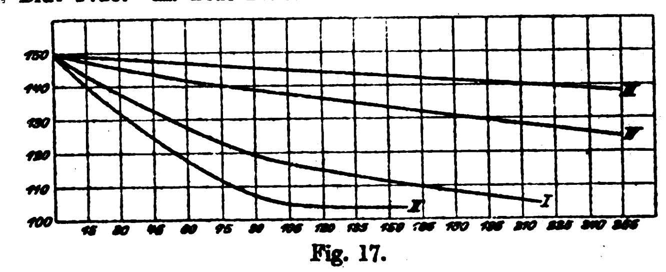


Fig. 17.

XVI. Schwein.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,5:25.

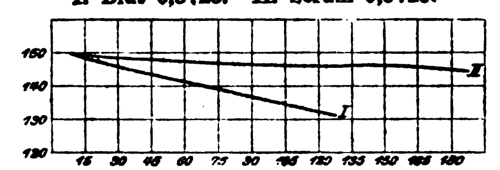


Fig 18.

[1] Blut 1:25 bedeutet 1 ccm Blut + Tributyrin (gesättigte Lösung) auf 25 ccm usw.

XVII. Schwein.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,2:25. III. Serum 2:25.

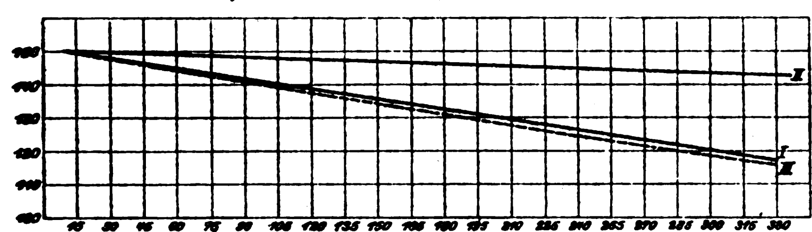


Fig. 19.

XVIII. Meerschweinchen.

I. Blut 1:50. II. Serum 1:50.
III. Serum-FNa 1:50.

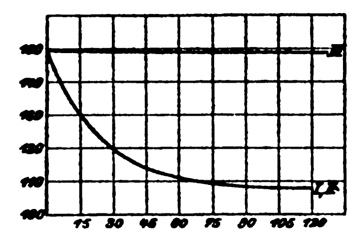


Fig. 20.

XIX. Meerschweinchen.

I. Blut 0,5:25. II. Blut 0,05:25.
III. Serum 0,5:25. IV. Serum 0,05:25.
V. Serum 0,05:25 aufgekocht.

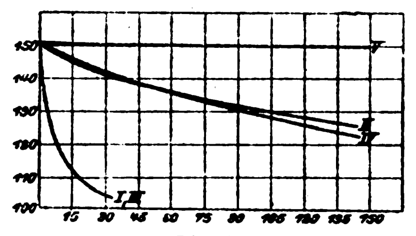


Fig. 21.

XX. Hammel.

I. Blut 0,5:25. II. Blut 1:25. III. Serum 0,5:25. IV. Serum 1:25.

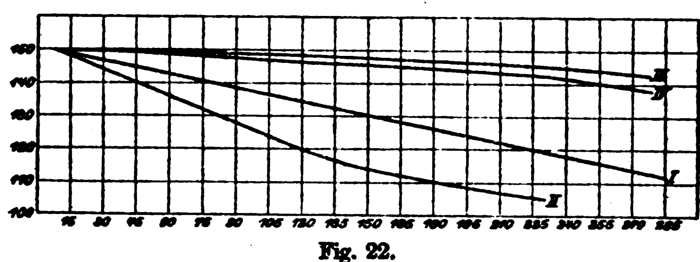


Fig. 22.

XXI. Kaninchen.

I. Blut 0,5:25. II. Serum 0,5:25. III. Serum-FNa 0,5:25.

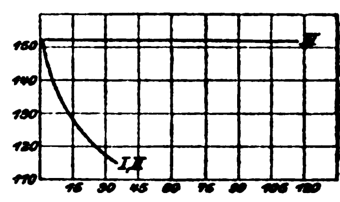


Fig. 23.

Im wesentlichen decken sich die Befunde hier mit denen am Monobutyrin gewonnenen: starke Wirkung beim Meerschweinchen und Kaninchen, sehr schwache beim Rind, Schwein, Hammel. Auch hier fand sich, Kaninchen und Meerschweinchen ausgenommen, das Serum durchweg viel schwächer wirksam als das entsprechende Blut. Es liegt daher nahe, in beiden Fällen nur ein Ferment anzunehmen. Kochen des Serums hob die Wirkung auch auf Tributyrin auf, FNa hemmt sie sehr stark.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt und auch auf Organe bzw. Preßsäfte ausgedehnt. Dieselbe Methode soll auch auf die Erforschung des proteolytischen Fermentes ausgedehnt werden, da, wie die Untersuchungen von Traube zeigen, die Eiweißkörper die Oberflächenspannung des Wassers, im Gegensatz zu ihren höheren Spaltprodukten, nicht beeinflussen.

Nachtrag zu der Arbeit:

Die Verwertung der Hefe im menschlichen Organismus.[1])

Von

Wilhelm Völtz und August Baudrexel.

(Eingegangen am 2. Februar 1911.)

Wir hatten in der betreffenden Arbeit über den N-Umsatz und -Ansatz, sowie den Energieumsatz während einer Grundregimeperiode und einer Hefeperiode (es wurden 100 g entbitterte Hefe pro die verzehrt) am Menschen berichtet und konstatiert, daß das Hefeeiweiß zu 86%, die Calorien der Hefe zu 88% resorbiert wurden. Der physiologische Nutzeffekt der Hefe hatte auf das Stickstoffgleichgewicht berechnet 74,8% ihres Energiegehaltes betragen. Da die Trockenhefe ungefähr 45% verdauliches Eiweiß enthält, so hatten wir gefolgert, daß sie den konzentriertesten und speziell eiweißreichsten Nahrungsmitteln zuzurechnen wäre.

Nun erschien es weiterhin von Interesse, zu untersuchen, wie hoch die Verdaulichkeit der organischen Substanz und der einzelnen N-freien Nährstoffe der Hefe, also des Fettes, der Rohfaser und der stickstofffreien Extraktstoffe [Organische Substanz — (Rohprotein + Rohfett + Rohfaser)] ist. Um die betreffenden Zahlen zu ermitteln, war es nur erforderlich, die Faeces der beiden in Betracht kommenden Perioden nach der Weender-Methode zu analysieren, da die erforderlichen Daten für die Hefe bereits vorlagen (l. c.).

Es wogen die lufttrockenen Faeces im Mittel pro die

während der Grundregimeperiode 36,97 g,

„ „ Hefeperiode . . 54,10 g.

Die folgende Tabelle I enthält die Zahlen für den Gehalt der Faeces beider Perioden an Einzelbestandteilen in Prozent,

[1]) Diese Zeitschr. 30, 457 bis 472, 1911.

Tabelle II dieselben in Gramm pro die. Aus den differenten Werten sind nach Gegenüberstellung derselben mit den betreffenden Daten über die Zusammensetzung der verzehrten Hefe in Tabelle III die Verdauungskoeffizienten der einzelnen Nährstoffe der Hefe berechnet und ebenfalls in Tabelle III eingetragen worden.

Tabelle I.

Die Faeces enthielten in Prozent:

	Trockensubstanz %	Asche %	Organische Substanz %	Rohprotein (N × 6,25) %	Rohfett %	Rohfaser %	N-freie Extraktstoffe %
Grundregimeperiode	86,88	10,69	76,19	32,81	16,19[1]	3,49	23,70
Hefeperiode . . .	82,31	13,71	68,60	36,16	12,83[2]	3,99	15,62

Tabelle II.

Die Faeces enthielten in Gramm im Mittel pro die:

	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein (N × 6,25) g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g
Grundregimeperiode (36,97 g pro die)	32,12	3,95	28,17	12,13	5,99	1,29	8,76
Hefeperiode (54,10 g pro die)	44,53	7,42	37,11	19,56	6,94	2,16	8,45
Differenz:	—	—	8,94	7,43	0,95	0,87	-0,31

Tabelle III.

	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Rohprotein (N × 6,25) g	Rohfett g	Rohfaser g	N-freie Extraktstoffe g
100 g Hefe enthielten	93,13	7,04	86,09	53,44	3,12	1,44	28,09
Im Kot der Hefeperiode mehr als im Kot der Grundregimeperiode . .			8,94	7,43	0,95	0,87	-0,31
Resorbiert: g			77,15	46,01	2,17	0,57	28,40
Resorbiert: %			89,6	86,1	69,6	39,6	101

[1]) 14,74% freies Fett und 1,45% Fett aus Seifen.

[2]) 11,42% „ „ „ 1,41% „ „ „

Die Werte für den verdaulichen Anteil des Fettes und insbesondere der Rohfaser können keinen Anspruch auf große Genauigkeit machen, weil der Gehalt der Hefe an diesen Stoffen ein zu geringer ist, als daß man auf diesem Wege zu ganz genauen Zahlen gelangen könnte. Cellulose, die den Hauptbestandteil der Rohfaser auszumachen pflegt, enthält die Hefe überhaupt nicht[1]). Die als Rohfaser bezeichnete Substanz ist bekanntlich der in 1,25 %iger Schwefelsäure und ebensolcher Kalilauge (Weender-Methode) unlösliche Rückstand der zu untersuchenden Substanz nach Subtraktion der Asche und der N-haltigen Verbindungen (N × 6,25). Die übrigen N-freien Stoffe der Hefe sind vollständig resorbiert worden. Die um 1 % höher gefundene Verdaulichkeit der N-freien Extraktstoffe liegt innerhalb der Fehlergrenzen des Stoffwechselversuches bzw. der analytischen Methoden.

Das Resultat dieser Untersuchung ist, daß die Nährstoffe der Hefe, und zwar

die organische Substanz zu rund . . . 90 %
das Eiweis (N × 6,25) zu rund . . . 86 %
das Rohfett zu rund . . . . 70 %
die Rohfaser zu rund . . . . 40 %
und die N-freien Extraktstoffe zu rund 100 %

im menschlichen Organismus resorbiert wurden.

---

[1]) C. van Wisseling, Jahrb. wiss. Bot. 31, 619, 1898.

Bemerkungen zu der Arbeit von **Stoklasa** und **Zdobnický**:

Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll.[1])

Von

Walther Löb.

(Aus der chem. Abteil. des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 11. Februar 1911.)

In der in der Überschrift zitierten Arbeit schreiben die Verfasser: „Schon längere Zeit tragen wir uns mit der Idee, das Problem zu lösen, wie eigentlich die Synthese der Kohlenhydrate in der lebenden Zelle der autotrophen Pflanzen vor sich geht." Dieser angestrebten Lösung dienen folgende Beobachtungen:

1. Aus Kohlensäure, Wasserdampf und Kalilauge entstehen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Spuren Formaldehyd; eine Kondensation des letzteren zu Kohlenhydrat tritt aber bei Gegenwart von Kaliumhydroxyd nicht im geringsten ein, „obgleich die Bedingungen für die Entstehung des Kohlenhydrates, nämlich die Dauer der Bestrahlung usw., die gleichen waren, wie bei den folgenden (positiv verlaufenden) Versuchen".

Aus diesen Worten geht hervor, daß **Stoklasa** und **Zdobnický** dem Formaldehyd, der aus Kohlensäure und Wasser entsteht, andere Eigenschaften zuschreiben als dem aus Kohlensäure und Wasserstoff in statu nascendi gebildeten. Denn der letztere liefert nach ihren Versuchen unter den gleichen Bedingungen reichlich Kohlenhydrat. Der Sachverhalt ist natürlich der folgende. Im ersten Falle ist so wenig Formaldehyd entstanden, daß, besonders da ein Teil sogleich in die Waschflasche durch den Gasstrom fortgeführt, ein anderer Teil durch die Kalilauge in Methylalkohol und Ameisensäure verwandelt wird, die Ausbeute an Kondensationsprodukten zum Nachweis zu gering wird. Sind die Bedingungen der Formaldehydausbeute günstiger ($CO_2 + H_2$), so bildet sich durch die Kalilauge auch entsprechend mehr Kohlenhydrat.

---

[1]) Diese Zeitschr. **30**, 433, 1911.

2. Die Verfasser finden, daß nur Wasserstoff in statu nascendi mit Kohlensäure Formaldehyd gebe, nicht aber Wasserstoffgas. Sie erwähnen, daß ihre Beobachtungen nicht mit denen von Berthelot und Gaudechon[1]) übereinstimmen; auch nicht mit meinen, bei der stillen Entladung erhaltenen.[2]) Aber aus ihren eigenen Versuchen geht hervor, daß sich auch bei ihnen die Reaktion zu Formaldehyd zwischen gasförmigem Wasserstoff und gasförmiger Kohlensäure abspielt. Sie finden nämlich den Formaldehyd in der an den Rückflußkühler erst angeschlossenen Waschflasche. Der Formaldehyd wird also durch den Gasstrom fortgeführt. Wäre er in der Flüssigkeit entstanden, was bei einer Reduktion durch Wasserstoff in statu nascendi der Fall sein müßte, so könnte er sich nicht aus der in großem Überschuß vorhandenen Lauge, die ihn sofort kondensiert oder spaltet bzw. als Salz[3]) enthält, in irgendwie erheblichen Mengen bei gewöhnlicher Temperatur verflüchtigen.

3. Stoklasa und Zdobnický sprechen weiter über den chemischen Charakter der durch „photochemische Synthese" erhaltenen Kohlenhydrate und ihren „labilen Formen". In ihrer Versuchsanordnung ist die photochemische Synthese mit der Formaldehydbildung beendet. Ob die Kondensationsgeschwindigkeit des Formaldehyds in Kalilauge durch die Bestrahlung beeinflußt wird, ist eine offene Frage, die nur durch exakte Messungen entschieden werden kann. Daß die Bildung der Zuckerarten in den Experimenten von Stoklasa und Zdobnický durch eine andere Wirkung bedingt ist, als durch den bekannten Einfluß der Kalilauge auf Formaldehyd, dafür ist auch nicht ein Versuch des Nachweises gebracht.

4. Schließlich: „Die Synthese des Zuckers aus Kaliumbicarbonat, das in Entstehung begriffen ist, und nascierendem Wasserstoff unter Einwirkung der ultravioletten Strahlen haben wir zuerst beobachtet, und die Resultate unserer diesbezüglichen Betrachtungen stehen bis jetzt allein da." Daß nach früheren Erfahrungen der molekulare Wasserstoff die Formaldehydsynthese mit Kohlensäure herbeiführt und daß nach meiner Ansicht auch bei Stoklasas und Zdobnickýs Versuchen die Reaktion im Gasraum, der übrigens auch einen wesentlichen Teil der wirksamen ultravioletten Strahlen absorbiert, verläuft, ist schon erwähnt. Das in Entstehung begriffene Kaliumbicarbonat versieht den Gasraum mit der erforderlichen Kohlensäure bereits durch seinen Kohlensäurepartialdruck; außerdem wird Kohlensäure dauernd hindurchgeleitet. Es wird also eine Schicht von Kohlensäure und Wasserstoffgas bestrahlt; darunter befindet sich die Flüssigkeit, die in freilich ziemlich komplizierter Weise die Gase liefert und die Eigenschaft hat, Formaldehyd in Kohlenhydrat zu verwandeln. Die Verfasser scheinen übrigens dem in Entstehung begriffenen Kaliumbicarbonat nicht durchgängig eine besondere Bedeutung zuzumessen;

---

[1]) Compt. rend. 150, 1169, 1327, 1517, 1690, 1910.

[2]) Zeitschr. f. Elektrochemie 12, 282, 1906.

[3]) Vgl. Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 2551, 1905.

wenigstens sprechen sie in der Überschrift ausdrücklich von Kohlensäureanhydrid, das ist CO_2.

Aus diesen Darlegungen dürfte hervorgehen, daß die Arbeit von Stoklasa und Zdobnický keinerlei neue Tatsachen enthält, da sowohl die Bildung von Formaldehyd aus Kohlensäure und Wasser und Kohlensäure und Wasserstoff, wie auch die Umwandlung des Formaldehyds durch Alkalien in Zuckerarten bekannte Erscheinungen sind. Die von den Verfassern angenommene Neuheit einiger Beobachtungen, wie der Rolle des nascierenden Wasserstoffs und Kaliumbicarbonats und eines verschiedenen Verhaltens des Formaldehyds aus Kohlensäure und Wasser einerseits und Kohlensäure und Wasserstoff andrerseits in alkalischer Lösung gegenüber den ultravioletten Strahlen beruht meines Erachtens auf einer falschen Deutung der Versuche.

Über die Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten beim erwachsenen Hunde, nebst Bemerkungen über den Stoffumsatz der Phosphorsäure und der Magnesia.

I. Mitteilung.

Von

Martin Kochmann.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 7. Februar 1911.)

Der Umstand, daß die Knochen der höheren Tiere und des Menschen zu einem sehr erheblichen Teil aus Kalksalzen bestehen, zeigt mit Deutlichkeit, daß diesen eine gewisse Bedeutung im Stoffwechsel zukommen muß. Aber es gibt auch sonst kein Organ, kein Gewebe und keine Zelle, die nicht Kalk in irgendeiner Form enthält. Es dürfte auch nicht zweifelhaft sein, daß diesem Kalk eine hohe physiologische Bedeutung zukommt, ja es ist vielleicht nicht mehr verwegen, den Gedanken auszusprechen, daß ohne Calciumionen eine normale Funktion der Zelle nicht möglich ist.

Trotz dieser augenscheinlichen Wichtigkeit des Kalks sind die Kenntnisse über seinen Stoffumsatz verhältnismäßig nur geringe. Zwar sind wir über Aufnahme und Resorption, sowie über die Ausscheidung hinreichend orientiert, wenn auch da noch vielfach Lücken bemerkbar sind, aber über den Bedarf des Organismus an diesem Mineralstoff herrschen die widersprechendsten Angaben.

Während auf der einen Seite Untersucher wie Dibbelt[1]) glauben, daß beim erwachsenen Hunde der Kalkbedarf so gering sei, daß selbst mit einer kalkarmen Nahrung die Tiere in kurzer Zeit ins Kalkgleichgewicht kommen, geben Forster[2]), E. Voit[3]), Fr. Müller[4]) u. a. an;

[1]) W. Dibbelt, Arbeit. a. d. pathol. Institut Tübingen 7, 144, 1909.

[2]) J. Forster, Zeitschr. f. Biol. 9, 297, 1873.

[3]) E. Voit, Zeitschr. f. Biol. 16, 93, 1880.

[4]) Fr. Müller, Zeitschr. f. Biol. 20, 327, 1884.

daß eine solche Nahrung das Kalkbedürfnis nicht zu befriedigen imstande sei. Auch die Angaben für den erwachsenen Menschen widersprechen sich in ähnlicher Weise. Bertram[1]) gibt den Minimalbedarf an Kalk mit 0,4 g CaO an, und Renvall[2]) kommt zu dem Ergebnis, daß 1,3 g CaO täglich Kalkgleichgewicht herstelle.

Dieser Unterschied in den Ansichten führt schon Albu und Neuberg in ihrer „Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels" zu der Meinung, daß „Art und Intensität des Kalkumsatzes außerordentlich stark abhängig sowohl von der Quantität wie von der Qualität der Nahrung sind". Wie man sich aber eine solche Abhängigkeit zu denken habe und ob eine solche tatsächlich bestehe, darüber geben die experimentellen Untersuchungen am erwachsenen Organismus keinen Aufschluß.

Erst in neuester Zeit haben Stoffwechseluntersuchungen am Säugling in dieser Hinsicht bemerkenswerte Ergebnisse gezeitigt. Rothberg[3]) konnte am kranken Säugling beobachten, daß die Vermehrung des Fettgehaltes der Nahrung die Kalkbilanz so schädlich beeinflussen kann, daß selbst negative Bilanzen zustande kommen. Birk[4]) konnte bezüglich des Verhaltens der Magnesia bei denselben Kindern ein gleiches konstatieren.

Auch die Kohlenhydrate, die zur Nahrung zugelegt werden, scheinen einen ähnlichen Einfluß auf den Kalkstoffwechsel der Säuglinge in den Versuchen von Rothberg und Birk auszuüben, wenn auch nur in schwachem Maße.

Beim nicht magendarmkranken Säugling wird in Stoffwechselversuchen L. F. Meyers[5]) durch die Zulage von Casein und Fett der Ansatz von Kalk und Phosphorsäure geringer; in einem Falle wird die Kalkbilanz sogar negativ.

In den Versuchen Freunds[6]) wird durch die Fettzulage die Ausscheidung des Kalks durch den Kot verringert. Bei dem einen Kind sank die Kalkausscheidung von 1,0305 g nach Zulage von Butter zur Nahrung auf 0,9713 g, und bei dem zweiten Kinde blieb sie annähernd gleich, wenigstens war die Verminderung nur sehr unbedeutend, 0,07 g CaO. In einer späteren Arbeit zeigt Freund[6]), daß bei Darreichung von Öl zwei Kinder ganz verschiedenes Verhalten bezüglich der Kalkretention aufweisen; das eine Kind zeigt Vermehrung, das andere Verschlechterung. Auch in den Versuchen von Steinitz[7]) blieb in den Sahneperioden, also bei fettreicher Nahrung, die Kalkbilanz bei zwei Kindern positiv, und wurde nur in einem Falle negativ. Die zusammen-

---

[1]) J. Bertram, Zeitschr. f. Biol. 14, 335, 1878.

[2]) G. Renvall, Skand. Arch. f. Phys. 16, 94, 1904.

[3]) O. Rothberg, Jahrb. f. Kinderheilk. 66, 1, 1907.

[4]) W. Birk, ebenda S. 300.

[5]) L. F. Meyer, Diese Zeitschr. 12, 422, 1908.

[6]) W. Freund, Jahrb. f. Kinderheilk. 61, 36, 1905 und diese Zeitschr. 16, 453, 1909.

[7]) F. Steinitz, Centralbl. f. inn. Med. 1904, 3.

fassenden Darstellungen L. F. Meyers und die klaren Ausführungen W. Freunds[1]) geben hierüber einen umfassenden Überblick.

So viel geht wohl aus diesen Ausführungen hervor, daß die Frage nach der Abhängigkeit des Kalkstoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten auch beim Säugling noch keineswegs geklärt ist.

Wie sich aber der erwachsene Organismus in dieser Hinsicht verhalten würde, ob mit anderen Worten bei diesem die organischen Nahrungskomponenten einen Einfluß auf die Kalkbilanz auszuüben vermögen, das ist meines Wissens bisher noch nicht der Gegenstand spezieller experimenteller Beobachtung gewesen, obwohl doch zahlreiche Versuche die Abhängigkeit der organischen Nahrungsstoffe voneinander behandelten. Um diese Lücke auszufüllen, sind die folgenden Untersuchungen unternommen worden.

Als Versuchstiere wurden Hunde gewählt. Sie wurden vor Beginn des Versuches längere Zeit mit gleichmäßigen Mengen von Sprattschem Hundekuchen ernährt und dann in einen großen runden Stoffwechselkäfig gesetzt, dessen Durchmesser 75 cm betrug. Die Tiere saßen im Käfig auf einem Drahtgitter, woran sie sich schnell gewöhnten, und was sie auch, ohne sichtbaren Schaden zu nehmen, gut ertrugen. Nur wenige Hunde waren so ungebärdig, daß sie vom Versuch abgesetzt werden mußten. Der Urin, den die Tiere ließen, floß über den trichterförmig geneigten Boden von verzinntem Eisenblech in einen Glaskolben. Der Kot, der in diesen Versuchen regelmäßig jeden Tag entleert wurde, blieb auf dem Drahtgitter liegen und wurde, wenn möglich, bald nach der Entleerung in eine Porzellanschale gebracht.

Sobald sich die Tiere an den Aufenthalt in dem Käfig gewöhnt hatten — die Käfige standen in einem hellen und luftigen Zimmer, das im Winter wohl geheizt und im Sommer kühl war —, wurde mit dem Versuch begonnen.

Der Kot wurde durch Zugabe von ungefähr 0,5 g Kohle zum Futter abgegrenzt, die aus Watte bereitet war und bis auf einen geringen, nicht wägbaren Rückstand verbrannte. Als Futter wurde den Tieren dieser Reihe während des Versuches Sprattscher Hundekuchen verabreicht, der im gepulverten Zustand erhältlich ist und im großen eingekauft wurde. Zu dem Futter wurden abgemessene Mengen destillierten Wassers zugesetzt, das Ganze wurde dann zu einem Brei verrührt und den Tieren frühmorgens auf einmal verabreicht. Die einzelnen Versuchsperioden waren verschieden lang, wie sich aus den Protokollen ergibt.

Im Futter sowohl, wie in den Ausscheidungen der Hunde Nr. 1 und 2 wurden die Mengen des Stickstoffs, Kalks und der Magnesia festgestellt. Bei Hund Nr. 3 wurde auch der Phosphorsäurestoffwechsel in den Kreis der Betrachtungen gezogen.

[1]) Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilkunde 1 und 3.

Bezüglich der analytischen Methoden sei folgendes erwähnt: Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. (Zerstörung der organischen Substanz mit reiner Schwefelsäure unter Zusatz von schwefelsaurem Kalium und Kupfer, Destillation des gebildeten Ammoniaks nach Zusatz von 25 % Natronlauge und Auffangen des Ammoniaks in $^n/_{10}$-Schwefelsäure, deren Überschuß durch $^n/_{10}$-Natronlauge zurücktitriert wird.)

Die Bestimmung des Kalks geschah in 200 ccm des sauren, filtrierten Urins, der vor der Filtration durch Zusatz von Essigsäure noch angesäuert war, in der Weise, daß der Kalk durch Zusatz von Ammonoxalat als oxalsaurer Kalk gefällt, auf einem aschefreien Filter gesammelt und dann geglüht wurde, und schließlich als CaO zur Wägung gelangte. Im Filtrat wurde die Magnesia durch Zusatz von Ammoniak bei Gegenwart eines Überschusses von Phosphorsäure und Ammoniumchlorid als phosphorsaure Ammoniakmagnesia gefällt, geglüht und als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen.

Beim Hundekuchen und Kot wurden die Kalk- und Magnesiabestimmungen nach Veraschung der organischen Substanz im Muffelofen im wesentlichen in derselben Weise vorgenommen. Die Veraschung geschah zunächst bei sehr kleiner Flamme bis zur Verkohlung und beginnenden Veraschung; dann wurden zu der abgekühlten Asche einige Kubikzentimeter Salpetersäure hinzugefügt, diese auf dem Wasserbade oder bei sehr kleiner Flamme verdampft und nun die Veraschung mit großer Flamme im Muffelofen fortgesetzt und sehr schnell beendigt. Die Asche wurde in Salzsäure gelöst, die Salzsäure auf dem Wasserbade wieder verjagt, die unlöslich gewordene Kieselsäure und die Spur Kohle nach Aufnahme der Asche mit Salzsäure und heißem Wasser abfiltriert. Durch Zusatz von Ammoniak bis zur beginnenden Trübung, die durch Essigsäure zum Teil wieder zum Verschwinden gebracht war, wurde das Eisen als phosphorsaures Eisenoxyd gefällt und durch Erwärmen zu Flocken zusammengeballt, die abfiltriert werden konnten. Im Filtrat wurden dann Kalk und Magnesia analysiert. Beim dritten Hunde wurde auch die Phosphorsäure in der Nahrung und in den Ausscheidungen bestimmt, und zwar im Urin durch Titration mit Uranacetat unter Verwendung von Ferrocyankalium als Indicator genau nach den Angaben von Neubauer-Vogel, im Kot und Hundekuchen nach der Zerstörung der organischen Substanz nach der Neumannschen Methode, wobei ich genau nach den Anweisungen verfuhr, wie sie Aron im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden angegeben hat.[1])

Die Zahlen in den Tabellen sind stets das Mittel von zwei übereinstimmenden Analysen.

Die Nahrung hatte folgende Zusammensetzung:

Für Versuch Nr. 1 und 2: Gehalt an N 3,661 %, an CaO 0,792 %, an MgO 0,3715 %.

---

[1]) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Berlin, Wien 1910.

Für Versuch Nr. 3 wurde neuer Hundekuchen gekauft, der eine andere Zusammensetzung hatte:

Gehalt an N 3,374 %, P_2O_5 1,997 %, CaO 1,1995 %, MgO 0,416 %.[1])

Es zeigt sich also, daß zwischen zwei zu verschiedenen Zeiten gekauften Proben zum Teil sehr wesentliche Unterschiede, besonders im CaO-Gehalt des Hundekuchens bestehen. Dagegen waren Veränderungen in der Zusammensetzung der einmal angeschafften Nahrung nicht zu konstatieren.

Tabelle I.

Hund Nr. 1.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	Urin: währ. der Periode ccm	täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	täglich g
1	28.—29. VI.	2	7050	200	500	—	705	352,5	370	185
2	30.VI.—1.VII.	2	7150	200	500	—	555	277,5	340	170

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i.d.Periode g	täglich g	durch Kot i.d.Periode g	täglich g	Gesamtmenge i.d.Periode g	täglich g	Verteilung im Urin %	im Kot %	Einnahmen i.d.Periode g	täglich g	Bilanz i. d. Periode g	täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	2	9,626	4,813	3,902	1,951	13,528	6,764	71,2	28,8	14,644	7,322	+ 1,116	+ 0,558
2	2	9,277	4,639	4,173	2,086	13,450	6,725	69,0	31,0	14,644	7,322	+ 1,194	+ 0,597
						CaO-Stoffwechsel.							
1	2	0,224	0,112	3,930	1,965	4,154	2,077	5,4	94,6	3,168	1,584	— 0,986	— 0,493
2	2	0,278	0,139	5,744	2,872	6,022	3,011	4,6	95,4	3,168	1,584	— 2,854	— 1,427
						MgO-Stoffwechsel.							
1	2	0,181	0,090	1,258	0,629	1,439	0,719	12,6	87,4	1,486	0,743	+ 0,047	+ 0,024
2	2	0,251	0,125	1,156	0,578	1,407	0,703	17,8	82,2	1,486	0,743	+ 0,079	+ 0,040

Dieser Versuch diente gewissermaßen als Vorversuch und war demgemäß von verhältnismäßig kurzer Dauer. Das Tier wurde 11 Tage vor Beginn des eigentlichen Versuchs, am 17. VI.

[1]) Aus diesen Zahlen läßt sich die Verteilung der Phosphorsäure mit großer Wahrscheinlichkeit entnehmen:

P_2O_5 an N gebunden (im Fleisch im Verhältnis 1:7,5)	0,490 g
P_2O_5 an CaO gebunden ($CaO:P_2O_5 = 168:142$) . . .	1,014 „
P_2O_5 an MgO gebunden ($MgO:P_2O_5 = 140:142$) . .	0,492 „
Demnach berechnet	1,996 g P_2O_5
Gefunden	1,997 g

Außer im Eiweiß findet sich die Phosphorsäure also wahrscheinlich als Tricalcium- und Magnesiumphosphat in der verfütterten Nahrung.

in den Käfig gebracht. Sein Gewicht betrug 7600 g. Nachdem es 4 Tage 150 g Hundekuchen und 500 g Wasser erhalten hatte, wurden ihm 50 g Hundekuchen zugelegt, da sein Körpergewicht abnahm. 7 Tage wurde der Hund dann noch vor Beginn des Versuchs bei 200 g Hundekuchen und der gleichen Wassermenge wie vorher im Käfig gehalten. Am 22. VI. begann der 4tägige Versuch, bei dem es sich zeigte, daß das nunmehr 7050 g schwere Tier bei der gereichten Nahrung an Körpergewicht zunahm, und zwar in der 2tägigen Periode um 100 g. Es retinierte Stickstoff, und zwar 0,597 g pro die, was ungefähr 3,75 g Körpereiweiß entsprechen würde. Auffallend sind die hohen Stickstoffzahlen im Kot, in dem während der ersten Periode 29 % des ausgeschiedenen Stickstoffs sich vorfinden. In der zweiten Periode erscheinen sogar 31 % N in den Faeces. Die Resorption und Ausnutzung des Stickstoffs im Hundekuchen ist also eine außerordentlich schlechte.

Der Kalkgehalt der Nahrung ist ein sehr hoher; selbst das kalkreichste Nahrungsmittel, das wir aufnehmen könnten, die Kuhmilch, steht weit zurück, denn ihr Kalkgehalt beträgt nur 1,6 g CaO im Liter. Diese Tatsache und der Umstand, daß der Organismus bei Ansatz von Eiweiß sicherlich auch Salze, also auch CaO gebraucht, würden die Erwartung rechtfertigen, daß der Hund Kalk ansetzen oder retinieren würde. Die Tabelle aber zeigt uns, daß mehr Kalk ausgeschieden wird, als eingenommen ist. In den ersten beiden Tagen werden täglich 0,493 g und in der zweiten Periode sogar 1,427 g CaO zuviel ausgeschieden.

Im Gegensatz dazu stehen die Magnesiabilanzen, die in beiden Perioden eine Retention aufweisen.

Wenn wir aus den angegebenen Analysenzahlen für das eigentümliche Verhalten der Kalkbilanzen eine Erklärung ausfindig machen wollen, so müssen wir die Zahlen untereinander in einen gewissen Zusammenhang bringen. In der zweiten Periode ist die „Negativität“ der CaO-Bilanz noch größer geworden als vorher, und daran ist besonders der Kot beteiligt. Eine einfache Überlegung führt zu der Frage: Welche von den untersuchten Bestandteilen des Kotes haben gleichfalls eine Vermehrung erfahren? Die Menge des frischen Kotes ist es nicht. Vielleicht hat die Trockensubstanz zugenommen. Es ist dies

bei der regelmäßigen Entleerung der Faeces nicht anzunehmen, aber mit Sicherheit kann ich darüber keinen Aufschluß geben, da die Analysen immer im frischen Kot vorgenommen und Trockenbestimmungen deshalb nicht gemacht wurden. Wir sehen auch, daß der Stickstoffgehalt des Kotes absolut wie auch relativ zugenommen hat. Die Differenzen zwischen der ersten und zweiten Periode sind aber denn doch zu geringfügig, um die großen Veränderungen des Kotkalks und der Bilanz zu erklären.

Weiter sehen wir, daß der größte Teil des Kalks, was ja schon längst bekannt ist, durch den Kot ausgeschieden wird, und nur 5,4 und 5,6% verlassen den Körper durch den Urin.

Auch bei der Magnesia sind die durch den Kot ausgeschiedenen Mengen größer als die, welche durch den Harn eliminiert werden. Immerhin sind letztere doch erheblicher und betragen in der Periode 1 12,5 und in der Periode 2 sogar 17,8% der ausgeschiedenen Gesamtmenge. Dabei fällt noch besonders auf, daß während die durch den Urin eliminierte Kalkmenge in der zweiten Periode kleiner ist als in der ersten, bei der Magnesia gerade das Umgekehrte eingetreten ist.

Schon aus diesem kurzen Versuch ersehen wir, daß trotz der sehr kalkreichen Nahrung die Kalkbilanz negativ ist und sogar den Wert von 3,84 g CaO in 4 Tagen erreicht. Wenn man nicht annehmen will, daß aus irgendeinem Grunde plötzlich Kalk, der irgendwie aus der Vorperiode im Darm liegen geblieben ist — bei der gleichen Nahrung und der guten Abgrenzung des Kotes eine sehr unwahrscheinliche Annahme — nunmehr ausgeschieden wird, so muß man schon zugeben, daß diese große Kalkmenge aus den Organen des Hundes stammt. 3,84 g CaO ist viel mehr als die Gesamtmenge des Kalks in allen Organen zusammen mit Ausnahme der Knochen. Es ist also nur logisch, wenn ich behaupte, daß mindestens 3,0 g CaO vom Skelettsystem abgegeben worden sind. Der fertige Knochen enthält aber ungefähr 16% Kalk, mithin hätte das Tier nach dieser Berechnung ungefähr 19 g Knochensubstanz in 4 Tagen eingebüßt. Nach meinen Untersuchungen beträgt der CaO-Gehalt eines Hundes am Ende der Lactationsperiode etwas weniger als 2%. Nehmen wir für den erwachsenen Hund sogar einen Kalkgehalt von 2% an, so würde der 7 kg schwere

Hund im ganzen 140 g CaO besitzen. Mindestens 98 % davon entfallen auf das Skelettsystem, und nur 2 % = 2,8 g auf die übrigen Organe des Körpers. Albu und Neuberg (l. c.) geben sogar an, daß 99 % des Gesamtkalkgehaltes dem Skelettsystem und nur 1 % den übrigen Organen zukomme.

Diese Verhältnisse schienen so eigenartig zu sein, daß ich an einem Hund von ungefähr gleichem Körpergewicht einen weiteren Versuch anstellte, der unter denselben äußeren Bedingungen verlaufen sollte und vom 23. VII. bis zum 26. VIII., also 35 Tage währte. Die Ergebnisse lassen sich aus der Übersichtstabelle II entnehmen.

Der Versuch scheidet sich in zwei Teile, da das Versuchstier bis zum 18. VIII. nur 200 g Hundekuchen erhielt, später aber eine Fettzulage bekam, für die allerdings die Menge des Hundekuchens verringert wurde.

Im ersten Teil des Versuches verlor das Tier an Körpergewicht, das von 6500 g auf 6230 g zurückging. Trotzdem sehen wir, daß es Stickstoff retinierte, und zwar nicht unerheblich, nämlich 24,232 g N. Das entspräche aber 151,5 g Eiweiß. Jedenfalls muß das Tier, auch wenn der retinierte Stickstoff nicht organisiert worden ist, Fett oder Wasser, oder beides verloren haben. Der Wasserverlust war aber jedenfalls nicht durch eine vermehrte Diurese bedingt, wie sich aus den Tabellen ergibt.

Tabelle II.

Hund Nr. 2.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen			Urin		Kot	
				Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	währ. der Periode ccm	täglich ccm	währ. der Periode g	täglich g
1	23.–24. VII.	2	6500	200	500	—	550	275	235	117,5
2	25.–26. VII.	2	6400	200	500	—	760	380	325	162,5
3	27.–28. VII.	2	6450	200	500	—	450	225	430	215
4	29.–31. VII.	3	6400	200	500	—	735	245	445	148,3
5	1.–3. VIII.	3	6530	200	500	—	780	260	425	141,7
6	4.–5. VIII.	2	6335	200	500	—	585	292,5	430	215
7	6.–8. VIII.	3	6350	200	500	—	675	225	450	150
8	9.–10. VIII.	3	6385	200	500	—	765	255	480	160
9	12.–14. VIII.	3	6230	200	500	—	665	221,7	400	133,3
10	17.–19. VIII.	3	6200	180	500	90	690	230	485	161,7
11	20.–22. VIII.	3	6250	180	500	90	625	208,3	395	131,7
12	23.–26. VIII.	4	6450	180	500	30	710	177,5	595	149

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung								Einnahmen		Bilanz	
		durch Urin		durch Kot		Gesamtmenge		Verteilung					
		i.d.Periode g	täglich g	i.d.Periode g	täglich g	i.d.Periode g	täglich g	im Urin %	im Kot %	i.d.Periode g	täglich g	i. d. Periode g	täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	2	7,584	3,792	3,076	1,538	10,660	5,330	71,1	28,9	14,644	7,322	+ 3,984	+ 1,992
2	2	10,618	5,309	3,981	1,990	14,599	7,299	72,7	27,3	14,644	7,322	+ 0,045	+ 0,023
3	2	7,029	3,515	4,816	2,408	11,845	5,923	59,3	40,7	14,644	7,322	+ 2,739	+ 1,399
4	3	13,324	4,441	4,461	1,487	17,785	5,928	74,9	25,1	21,966	7,322	+ 4,181	+ 1,394
5	3	12,510	4,170	4,572	1,524	17,082	5,694	73,2	26,8	21,966	7,322	+ 4,884	+ 1,628
6	2	9,774	4,887	5,237	2,619	15,011	7,506	65,1	34,9	14,644	7,322	– 0,367	– 0,184
7	3	12,967	4,322	5,355	1,785	18,322	6,107	70,8	29,2	21,966	7,322	+ 3,644	+ 1,215
8	3	13,938	4,646	6,000	2,000	19,938	6,646	69,9	30,1	21,966	7,322	+ 2,028	+ 0,676
9	3	14,062	4,687	4,872	1,624	18,934	6,311	74,3	25,7	21,966	7,322	+ 3,032	+ 1,011
10	3	14,307	4,769	5,432	1,811	19,739	6,580	72,5	27,5	19,769	6,590	+ 0,030	+ 0,010
11	3	14,587	4,862	5,143	1,714	19,730	6,576	73,9	26,1	19,769	6,590	+ 0,039	+ 0,014
12	4	17,186	4,297	6,914	1,728	24,100	6,025	79,6	20,4	26,359	6,590	+ 2,259	+ 0,565
						Ca-O-Stoffwechsel.							
1	2	0,060	0,030	3,175	1,587	3,235	1,617	1,9	98,1	3,168	1,584	– 0,067	– 0,033
2	2	0,086	0,043	4,147	2,074	4,233	2,117	2,0	98,0	3,168	1,584	– 1,065	– 0,533
3	2	0,100	0,050	4,007	2,003	4,107	2,053	2,5	97,5	3,168	1,584	– 0,939	– 0,469
4	3	0,240	0,080	4,299	1,433	4,539	1,513	5,6	94,4	4,752	1,584	+ 0,213	+ 0,071
5	3	0,143	0,048	4,472	1,491	4,615	1,539	3,2	96,8	4,752	1,584	+ 0,137	+ 0,045
6	2	0,161	0,081	4,227	2,113	4,388	2,194	3,8	96,2	3,168	1,584	– 1,220	– 0,610
7	3	0,178	0,059	4,776	1,592	4,954	1,651	3,7	96,3	4,752	1,584	– 0,202	– 0,067
8	3	0,099	0,033	6,333	2,111	6,432	2,144	1,6	98,4	4,752	1,584	– 1,680	– 0,560
9	3	0,227	0,076	4,444	1,481	4,671	1,557	5,1	94,9	4,752	1,584	+ 0,081	+ 0,027
10	3	0,136	0,045	5,744	1,915	5,880	1,960	2,4	97,6	4,277	1,426	– 1,603	– 0,534
11	3	0,070	0,023	6,101	2,034	6,171	2,057	1,1	98,9	4,277	1,426	– 1,894	– 0,631
12	4	0,043	0,011	8,202	2,051	8,245	2,062	0,5	99,5	5,702	1,426	– 2,543	– 0,636
						MgO-Stoffwechsel.							
1	2	0,158	0,079	1,449	0,725	1,607	0,804	9,8	90,2	1,486	0,743	– 0,121	– 0,061
2	2	0,209	0,105	1,484	0,742	1,693	0,847	12,3	87,7	1,486	0,743	– 0,207	– 0,104
3	2	0,193	0,096	1,706	0,853	1,899	0,949	10,2	89,8	1,486	0,743	– 0,413	– 0,206
4	3	0,346	0,115	1,706	0,569	2,052	0,684	16,9	83,1	2,230	0,743	+ 0,178	+ 0,059
5	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	2	0,271	0,136	1,247	0,623	1,518	0,759	17,9	82,1	1,486	0,743	– 0,032	– 0,016
7	3	0,309	0,103	1,680	0,560	1,989	0,663	15,5	84,5	2,230	0,743	+ 0,241	+ 0,080
8	3	0,278	0,093	2,288	0,763	2,566	0,856	10,8	89,2	2,230	0,743	– 0,336	– 0,113
9	3	0,411	0,137	1,573	0,524	1,984	0,661	20,7	79,3	2,230	0,743	+ 0,246	+ 0,082
10	3	0,348	0,116	1,843	0,614	2,191	0,730	15,9	84,1	2,007	0,669	– 0,184	– 0,061
11	3	0,035	0,012	1,471	0,490	1,506	0,502	2,3	97,7	2,007	0,669	+ 0,501	+ 0,163
12	4	0,048	0,012	2,454	0,614	2,502	0,626	1,9	98,1	2,676	0,669	+ 0,174	+ 0,047

Besonders interessant ist der Vergleich des N-Stoffwechsels mit dem des Kalks: Während der Zeit vom 23. VII. bis 14. VIII. hat das Tier nämlich 4,642 g CaO verloren. Nach unserer früheren Rechnung würde das 6,5 kg schwere Tier bei einem Kalkgehalt von 2 % im ganzen nur 130 g CaO besessen haben. Da

die Weichteile nur 1 bis 2% des Gesamtkalkgehaltes für sich in Anspruch nehmen, so muß auch hier eine Einschmelzung des Knochengewebes stattgefunden haben, ja es ist sogar angängig, den Gesamtverlust auf das Skelettsystem zu beziehen, da wir aus den Untersuchungen von Aron[1]) wissen, daß die Weichteile den Kalk nur sehr schwer abgeben. Während der ersten 23 Tage hat also das Tier ungefähr 3,5% des Gesamtkalkgehalts seines Knochensystems hergeben müssen.

Die Frage nach dem Grunde dieses Kalkverlustes kann bis zu einem gewissen Grade durch einen Vergleich der einzelnen Zahlen der Tabelle beantwortet werden: Es ist gar kein Zweifel, daß die Größe der Stickstoffretention in den einzelnen Perioden des Versuches einen Einfluß auf die Kalkbilanz erkennen läßt. Wird die Retention des Stickstoffs nämlich eine große, so vermindert sich der Kalkverlust. Daß dabei aber zwischen Stickstoff und Kalk kein umgekehrt proportionales Verhältnis herrscht, versteht sich eigentlich von selbst; immerhin ist es doch ganz deutlich, daß in den Perioden mit hohem Stickstoffansatz die Kalkverluste geringer werden und die Kalkbilanz sogar positiv werden kann. Das einzige Mal, wo die N-Bilanz negativ ist, zeigt auch die Kalkbilanz den größten negativen Wert. In der dritten Periode findet sich gleichfalls eine ziemlich starke Stickstoffretention, aber trotzdessen ist der Kalkverlust erheblich. Vergleichen wir allerdings die Zahlen mit denen der Periode Nr. 2, so ergibt sich auch hier eine Besserung der Kalkbilanz (s. auch die N-Menge im Kot). Nach meinem Dafürhalten ist also aus diesen Zahlen ein deutlicher Einfluß der Stickstoffretention auf die Kalkbilanz zu konstatieren. Es scheint, als brauche der retinierte Stickstoff Kalk, vielleicht zu seiner Organisation.

Ebenso sicher ist es aber auch, daß neben dieser Abhängigkeit von der Stickstoffbilanz noch ein anderer Faktor die Kalkbilanz beeinflußt, da es sonst unmöglich wäre, daß überhaupt Kalkverluste eintreten, die bei ungefährem Stickstoffgleichgewicht über 0,5 g täglich betragen.

Besser als in dem vorigen Versuch sehen wir bei diesem zweiten, daß in Perioden starken Kalkverlustes die Stickstoff-

[1]) H. Aron, diese Zeitschr. 12, 28, 1908.

zahlen im Kot verhältnismäßig große sind, so daß eine Abhängigkeit von der Größe des Kotstickstoffs nicht ganz ausgeschlossen erscheint. Daß es sich aber nicht etwa um eine mangelhafte Resorption von Nahrungskalk handelt, läßt sich aus der Höhe der Kotkalkzahlen ohne weiteres entnehmen. Es ist natürlich auch leicht möglich, daß nicht der Kotstickstoff diesen Einfluß ausübt, sondern irgend eine andere Substanz im Kot, die mit der Stickstoffmenge einigermaßen parallel geht. Ich glaube, daß es vorderhand am besten ist zu sagen, daß irgend eine aus der Nahrung stammende Schädigung auf den Kalkstoffwechsel im ungünstigen Sinne einwirke. Wenn es auch nicht möglich ist, diese beiden Faktoren, welche den Kalkstoffwechsel beeinflussen, zahlenmäßig zum Ausdruck zu bringen, so ergibt sich doch aus diesen Versuchen, daß tatsächlich die Kalkbilanz von zwei Komponenten abhängig ist. Bei negativer Stickstoffbilanz addieren sich diese und schädigen den Kalkstoffwechsel, bei positiver Stickstoffbilanz wird die „Nahrungsschädigung" zum Teil oder gänzlich übertönt.

In dem zweiten Teil des Versuches, der 2 Tage nach Beendigung des ersten fortgesetzt wird, ohne daß der Hund den Käfig verlassen oder eine andere Nahrung bekommen hätte, werden dem Tiere 180 g Hundekuchen, 500 ccm Wasser und 90 bzw. 30 g Schweinefett gereicht.

Wir sehen in diesen Perioden das Körpergewicht innerhalb 10 Tagen um 250 g steigen. Die Diurese bleibt im wesentlichen unverändert, die Menge des frischen Kotes schwankt in den gewöhnlichen Grenzen. Die Stickstoffbilanz bleibt positiv, obwohl etwas weniger Stickstoff im Futter gereicht wird, und steigt von 0,010 g auf 0,565 g täglich. In der ersten Fettperiode wird ungefähr ebenso viel Stickstoff angesetzt wie in der Periode Nr. 2, und demgemäß ist die Kalkbilanz dieselbe. Aber schon in der zweiten Fettperiode wird die Kalkbilanz stärker negativ, und in der dritten Periode erreicht die Kalkbilanz negative Werte, die größer sind als selbst bei gleichzeitigem Stickstoffverlust. Dies kann aber nur einem Einfluß zu danken sein, der gleichzeitig die Stickstoffbilanz bessert. Mit Notwendigkeit werden wir auf das Fett der Nahrung gewiesen, das wir als Ursache annehmen können. Dabei ist es auffallend, daß die durch den Urin ausgeschiedene Kalkmenge immer kleiner

wird und schließlich den kleinsten, in diesem Versuch beobachteten Wert erreicht, während die Kotwerte dementsprechend steigen, so daß in der letzten Periode 95,5% der gesamten Kalkmenge durch die Faeces ausgeschieden werden.

Es hat also ganz den Anschein, als ob das Fett zwar den Ansatz des Stickstoffs begünstigt, die Kalkbilanz aber im negativen Sinne beeinflußt, und zwar dadurch, daß besonders die Kalkausscheidung im Kot erhöht wird; dieser ungünstige Einfluß des Fettes ist so stark, daß er sogar die Wirkung der Stickstoffretention überwiegt. Eine Erklärung dieser merkwürdigen Tatsachen soll später versucht werden.

Von dem Magnesiastoffwechsel kann man sich in diesen Versuchen kein klares Bild machen. Bald hat man den Eindruck, daß er sich dem Kalkstoffwechsel anschließe, bald wieder dem des Stickstoffs. Das stimmt auch mit den schwankenden Angaben in der Literatur überein. Während beispielsweise Birk (l. c.) beim magendarmkranken Säugling zeigen konnte, daß sich die Magnesia wie der Kalk verhalte, kommen wieder andere, wie Gottstein[1]), durch Versuche am Tier zu der Überzeugung, daß die Magnesia mit dem Stickstoff parallel geht. Auffallend ist die Tatsache, daß in den Fettperioden sich auch die durch den Urin ausgeschiedene Menge der Magnesia verringert; denn während sonst im Durchschnitt etwa 10 bis 20% der Magnesia durch den Urin eliminiert werden, ist der Anteil der Urinmagnesia in der dritten Fettperiode nur noch 1,9% der Gesamtmenge.

In einem dritten Versuch (Tab. III) war beabsichtigt, die Futtermengen zu verändern und unter diesen Umständen die einzelnen Ausscheidungen zu untersuchen. Gleichzeitig wurde in diesem Versuch auch die Phosphorsäurebilanz aufgestellt.

Es werden dem Hunde zunächst nur 100 g Hundekuchen und 300 ccm destilliertes Wasser gereicht. Diese Nahrung ist eine ungenügende, und demgemäß zerfällt stickstoffhaltige Körpersubstanz; die N-Bilanz ist mit — 2,120 g pro Tag stark negativ. Das Körpergewicht nimmt in dieser Periode um 150 g ab, der Stickstoffverlust von 8,497 g würde 51 g Muskelsubstanz entsprechen. Auch die Phosphorsäure-, Kalk- und Magnesiabilanz

[1]) E. Gottstein, Inaug.-Diss., Breslau 1901.

Tabelle III.

Hund Nr. 3.

Nr. der Periode	Datum 1909	Periode von Tagen	Gew. des Tieres g	Tägl. Futter u. Zulagen: Hundekuchen g	destill. Wasser ccm	Fett g	Urin: währ. der Periode ccm	täglich ccm	Kot: währ. der Periode g	täglich g
1	5.—8. X.	4	6750	100	300	—	1155	288,8	220	55
2	9.—13. X.	5	6600	150	300	—	1130	226	410	82
	14.—18. X.									
3	15.—21. X.	3	6450	150	300	—	640	213,3	270	90
4	22.—26. X.	5	6280	150	300	—	1075	215	455	91
5	27.—31. X.	5	6260	175	300	—	850	170	380	76
6	1.—5. XI.	5	6320	175	300	—	905	181	605	121
7	6.—11. XI.	6	6355	200	300	—	925	154,2	561	93,5
8	12.—16. XI.	5	6420	200	300	—	770	154	624	120,8
9	17.—21. XI.	5	6460	200	300	—	740	148	574	114,8
10	22.—26. XI.	5	6300	200	300	—	755	151	555	111
11	27.XI.—1.XII.	5	6350	200	300	—	725	145	550	110
12	2.—6. XII.	5	6540	200	300	—	910	182	505	101

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung: durch Urin i.d. Periode g	durch Urin täglich g	durch Kot i.d. Periode g	durch Kot täglich g	Gesamtmenge i.d. Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i.d. Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
						N-Stoffwechsel.							
1	4	19,255	4,814	3,896	0,974	23,151	5,788	83,2	16,8	14,672	3,668	— 8,479	— 2,120
2	5	24,595	4,919	6,630	1,326	31,225	6,245	73,1	26,9	27,510	5,502	— 3,715	— 0,743
2a	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	3	15,222	5,074	4,120	1,373	19,342	6,447	72,9	27,1	16,506	5,502	— 2,836	— 0,945
4	5	23,750	4,750	7,171	1,434	30,921	6,184	80,0	20,0	27,510	5,502	— 3,411	— 0,682
5	5	25,200	5,040	6,923	1,385	32,123	6,425	80,0	20,0	32,095	6,419	— 0,028	— 0,006
6	5	24,864	4,973	9,262	1,852	34,126	6,825	62,7	37,3	32,095	6,419	— 2,031	— 0,406
7	6	27,888	4,648	9,153	1,525	37,041	6,173	67,2	32,8	44,016	7,336	+ 6,975	+ 1,163
8	5	24,780	4,956	10,474	2,095	35,254	7,051	57,7	42,3	33,740	6,748	— 1,514	— 0,303
9	5	26,488	5,298	8,692	1,738	35,180	7,036	67,2	32,8	33,740	6,748	— 1,440	— 0,288
10	5	26,488	5,298	8,547	1,709	35,035	7,007	67,7	32,3	33,740	6,748	— 1,295	— 0,259
11	5	23,408	4,682	7,888	1,578	31,296	6,260	66,3	33,7	33,740	6,748	+ 2,444	+ 0,488
12	5	25,795	5,159	6,378	1,276	32,173	6,435	75,3	24,7	33,740	6,748	+ 1,567	+ 0,313
						P_2O_5-Stoffwechsel.							
1	4	4,634	1,159	5,302	1,325	9,936	2,484	46,6	53,4	8,762	2,191	— 1,174	— 0,293
2	5	6,002	1,200	9,686	1,937	15,688	3,137	38,3	61,7	3,286	3,286	+ 0,741	+ 0,149
3	3	3,728	1,243	6,311	2,104	10,040	3,347	37,1	62,9	9,857	3,286	— 0,182	— 0,061
4	5	6,060	1,212	11,312	2,262	17,372	3,474	34,9	65,1	16,429	3,286	— 0,943	— 0,188
5	5	6,096	1,219	10,191	2,038	16,287	3,257	37,4	62,6	19,167	3,833	+ 2,880	+ 0,576
6	5	6,523	1,305	12,511	2,502	19,034	3,807	34,3	65,7	19,167	3,834	+ 0,133	+ 0,027
7	6	7,500	1,250	13,503	2,251	21,003	3,501	35,7	64,3	26,286	4,381	+ 5,283	+ 0,880
8	5	6,500	1,300	12,334	2,467	18,834	3,767	34,5	65,5	19,971	3,994	+ 1,137	+ 0,227
9	5	5,368	1,074	14,539	2,908	19,907	3,982	27,0	73,0	19,971	3,994	+ 0,064	+ 0,012
10	5	5,280	1,056	14,075	2,815	19,355	3,871	27,3	72,7	19,971	3,994	+ 0,616	+ 0,123
11	5	5,082	1,016	10,950	2,190	16,032	3,206	31,7	68,3	19,971	3,994	+ 3,939	+ 0,788
12	5	5,425	1,085	10,100	2,020	15,525	3,105	34,9	65,1	19,971	3,994	+ 4,446	+ 0,889

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr. d. Periode	Tage	Ausscheidung durch Urin i.d.Periode g	Ausscheidung durch Urin täglich g	Ausscheidung durch Kot i.d.Periode g	Ausscheidung durch Kot täglich g	Gesamtmenge i.d.Periode g	Gesamtmenge täglich g	Verteilung im Urin %	Verteilung im Kot %	Einnahmen i.d.Periode g	Einnahmen täglich g	Bilanz i. d. Periode g	Bilanz täglich g
							CaO-Stoffwechsel.						
1	4	0,067	0,017	4,472	1,118	4,539	1,135	1,5	98,5	4,111	1,028	– 0,428	– 0,107
2	5	0,081	0,016	7,334	1,467	7,415	1,483	1,1	98,9	7,709	1,542	+ 0,294	+ 0,059
3	3	0,047	0,016	4,408	1,469	4,455	1,485	1,1	98,9	4,625	1,542	+ 0,170	+ 0,057
4	5	0,068	0,014	8,009	1,602	8,077	1,616	0,9	99,1	7,709	1,542	– 0,368	– 0,074
5	5	0,072	0,014	7,191	1,438	7,263	1,452	1,0	99,0	8,993	1,799	+ 1,730	+ 0,347
6	5	0,060	0,012	10,288	2,058	10,348	2,070	0,6	99,4	8,993	1,799	– 1,355	– 0,271
7	6	0,061	0,010	9,658	1,610	9,719	1,620	0,6	99,4	12,334	2,056	+ 2,615	+ 0,436
8	5	0,048	0,010	11,025	2,205	11,073	2,215	0,5	99,5	11,995	2,399	+ 0,922	+ 0,184
9	5	0,048	0,010	12,532	2,506	12,580	2,516	0,4	99,6	11,995	2,399	– 0,585	– 0,117
10	5	0,034	0,007	12,804	2,561	12,838	2,568	0,3	99,7	11,995	2,399	– 0,843	– 0,169
11	5	0,029	0,006	11,760	2,352	11,789	2,358	0,3	99,7	11,995	2,399	+ 0,206	+ 0,041
12	5	0,046	0,009	10,760	2,152	10,806	2,161	0,4	99,6	11,995	2,399	+ 1,189	+ 0,238
							MgO-Stoffwechsel.						
1	4	0,321	0,080	1,370	0,343	1,691	0,423	18,9	81,1	1,495	0,374	– 0,196	– 0,049
2	5	0,056	0,011	2,204	0,441	2,260	0,452	2,4	97,6	2,804	0,561	+ 0,544	+ 0,109
3	3	0,037	0,012	1,443	0,481	1,480	0,493	2,4	97,6	1,682	0,561	+ 0,202	+ 0,068
4	5	0,117	0,023	2,588	0,518	2,706	0,541	4,3	95,7	2,804	0,561	+ 0,098	+ 0,020
5	5	0,050	0,010	2,451	0,490	2,501	0,500	2,0	98,0	3,271	0,654	+ 0,770	+ 0,154
6	5	0,080	0,016	3,521	0,704	3,601	0,720	2,2	97,8	3,271	0,654	– 0,330	– 0,066
7	6	0,050	0,008	3,238	0,540	3,288	0,548	1,5	98,5	4,486	0,748	+ 1,198	+ 0,200
8	5	0,038	0,008	3,926	0,785	3,964	0,793	1,0	99,0	4,158	0,832	+ 0,194	+ 0,039
9	5	0,026	0,005	3,869	0,774	3,895	0,779	0,6	99,4	4,158	0,832	+ 0,263	+ 0,053
0	5	0,052	0,010	4,038	0,808	4,090	0,818	1,2	98,8	4,158	0,832	+ 0,068	+ 0,014
11	5	0,124	0,025	3,479	0,696	3,603	0,721	3,5	96,5	4,158	0,832	+ 0,555	+ 0,111
12	5	0,309	0,062	3,522	0,704	3,831	0,766	8,1	91,9	4,158	0,832	+ 0,327	+ 0,066

sind negativ, trotz der sehr erheblichen Einnahme an diesen Substanzen, die eigentlich genügen müßte, Gleichgewicht herzustellen. In der nächsten Periode werden 150 g Hundekuchen verfüttert; die Stickstoffbilanz bleibt immer noch negativ, beträgt aber nur noch ein Drittel der ersten Periode. Man müßte jetzt erwarten, daß in der Kalkbilanz ein starkes Plus auftreten würde, daß wenigstens die in dieser Periode mehr eingeführte Menge von 0,5 g CaO zum Ansatz kommt. Die Bilanz wird in der Tat positiv, aber doch nur in sehr geringem Grade. Die Verhältnisse im Magnesiastoffwechsel sind bessere; hier gelangt nahezu ein Fünftel der eingeführten Menge zum Ansatz. Die Phosphorsäurebilanz müßte in dieser Periode eigentlich negativ sein, wenn sie nur mit dem Stickstoff parallel gehen würde. Sie ist aber positiv, und man gewinnt schon dadurch

den sicheren Eindruck, daß ihre Bilanz auch vom Kalk und der Magnesia abhängig ist. Jedenfalls ist es zweifellos, daß die phosphorsaure Magnesia und der phosphorsaure Kalk der Nahrung resorbiert werden können, denn sonst wäre eine positive Bilanz nicht möglich.

Wenn die einzelnen Werte nach der früheren Analyse des Hundekuchens rechnerisch miteinander verglichen werden, so ergibt sich folgendes: Mit dem Stickstoffverlust von 0,743 g werden, da im Fleisch des Hundekuchens das Verhältnis N : P_2O_5 wie 7,5 : 1 ist, 0,099 g P_2O_5 zu Verlust gehen.

Den angesetzten 0,059 g CaO entsprechen . .	0,050 g P_2O_5
und den 0,109 g MgO entsprechen	0,110 g P_2O_5
zusammen	0,160 g P_2O_5
Durch den N-Verlust bedingt	— 0,099 g P_2O_5
Mithin hätten angesetzt werden müssen . .	+ 0,061 g P_2O_5

Die gefundenen Werte stimmen mit den berechneten nicht so überein, wie es theoretisch denkbar wäre. Immerhin ist die Abhängigkeit vom Stickstoff einerseits und der MgO- und CaO-Bilanz andererseits nicht zu verkennen.

Auch in der dritten Periode liegen die Verhältnisse ähnlich. Die Stickstoffbilanz ist etwas stärker negativ als in der Periode Nr. 2, die Kalk- und Magnesiabilanz dagegen positiv, letztere aber schwächer als in der vorhergehenden Periode; die Folge ist eine leicht negative P_2O_5-Bilanz.

Von einer stark in die Augen fallenden Abhängigkeit des Kalks von der Stickstoffbilanz einerseits und einem zweiten Faktor, der in der Nahrung begründet ist und einen schädigenden Einfluß auf die Kalkbilanz ausübt, sind in diesem Versuch demnach nur Andeutungen vorhanden, wie es auch aus den Zahlen der übrigen Perioden dieses Versuches zu entnehmen ist.

Das findet in einem Vergleich der Kalkmengen mit denen des Stickstoffs in der Nahrung seine Erklärung. Die Mengen des Kalks sind in dieser Versuchsreihe so enorm groß — sie verhalten sich zum Stickstoff wie 1 : 3 —, daß eben dieser schädigende „Nahrungsfaktor" nicht zum Vorschein kommen kann, da die Kalkmenge eigentlich den weitgehendsten Forderungen genügt.

Durch dieses Moment ist es bedingt, daß die Aufgabe, den Einfluß der Nahrungsmengen auf den Kalk-, Magnesia- und

Phosphorsäurestoffwechsel einer Untersuchung zu unterziehen, durch diesen Versuch keine endgültige Lösung erfuhr.

In weiteren Mitteilungen werde ich zusammen mit Herrn cand. med. E. Petzsch über weitere Versuche berichten, die die Frage nach der Abhängigkeit des anorganischen Stoffwechsels von den organischen Nahrungskomponenten besser beantworten werden.

Aus den bisher veröffentlichten Versuchen lassen sich demnach zunächst nur folgende Schlüsse ziehen:

1. Selbst bei Verabreichung einer sehr kalkreichen Nahrung, wie es der Hundekuchen ist, ist es bei Hunden nicht immer möglich, bei gleichzeitigem Stickstoffgleichgewicht oder -ansatz auch Gleichgewicht oder Ansatz des Kalks zu erzielen.

2. Wenn das Verhältnis des Kalks zum Stickstoff im Hundekuchen 1:4,5 beträgt, wie es bei den ersten beiden Versuchen der Fall ist, so zeigt sich mit Deutlichkeit die Tatsache, daß der Kalkstoffwechsel teilweise vom Stickstoff beeinflußt wird, zum größeren Teile aber durch einen anderen Faktor eine Schädigung in dem Sinne erleidet, daß nicht unbeträchtliche Kalkmengen dem Organismus entzogen werden. Diese Schädigung wird — um nichts vorwegzunehmen — durch die Menge und Art der Nahrung herbeigeführt.

3. Erst wenn das Verhältnis Kalk zu Stickstoff im Hundekuchen 1:3 beträgt, ist diese „Nahrungsschädigung" nicht mehr zu beobachten. (S. Versuch Nr. 3.)

4. Der Magnesia- und Phosphorsäurestoffwechsel zeigt sich in den Versuchen nicht scharf charakterisiert.

Über den Nucleasegehalt verschiedener Organe des Menschen und der Tiere.

Von

A. J. Juschtschenko.

(Aus dem Laboratorium für biologische Chemie des Kaiserlichen Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(*Eingegangen am 12. Februar 1911.*)

Den Nucleasegehalt bestimmen die meisten Forscher [Steudel[1]), Schmiedeberg[2])[3]), Schittenhelm[4])[5]), Schmidt[6]), Jones[7])[9]), Austrian[8]), Battelli und Stern[10]), Frank[11]),

---

[1]) Steudel, Nucleine, Nucleinsäure und ihre Spaltprodukte. Biochem. Centralbl. 1907.

[2]) Schmiedeberg, Über die Nucleinsäure aus Lachsmilch. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 43.

[3]) Schmiedeberg, Beiträge zur Kenntnis der tierischen Nucleinsäure. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51.

[4]) A. Schittenhelm, Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Zeitschr. f. phys. Chem. 1905.

[5]) A. Schittenhelm, Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. phys. Chem. 1908.

[6]) Schittenhelm und Schmidt, Ablauf des Nucleinstoffwechsels in menschlischen Organen. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1907.

[7]) Jones, Über das Vorkommen der Guanate in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz der Schweine. Zeitschr. f. phys. Chem. 1905.

[8]) Jones und Austrian, Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. phys. Chem. 1906.

[9]) Jones, Über die Beziehung der aus wässerigem Organextrakt gewonnenen Nucleinfermente zu den physiologischen Vorgängen im lebenden Organismus. Zeitschr. f. phys. Chem. 1910.

[10]) Battelli und Stern, Untersuchungen über die Uricase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 1909.

[11]) Frank und Schittenhelm, Über die Umsetzung verfütterter Nucleinsäure beim normalen Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. 1909.

Wiener[1]), Iwanoff[2]), Sachs[3]), Brugsch[4])], nach der bei der enzymatischen Nucleinsäurespaltung erhaltenen Purinbasenmenge. Araki[5]), Kikkoji[6]) und einige andere berechnen den Gehalt dieses Ferments aus der bei dieser Spaltung erhaltenen Phosphorsäuremenge.

Auf Frau Dr. N. Siebers Vorschlag hin bediente ich mich zur Bestimmung des Nucleasegehalts und der Verteilung desselben in verschiedenen Organen und Geweben des Menschen und der Tiere der zweiten Methode.

Um einem Vorwurf, daß es sich bei dieser Spaltung nicht nur um Phosphorsäure aus der Nucleinsäure handeln könnte, vorzubeugen, bestimmten wir die in der Nucleaselösung vorhandene, aus Nucleoalbuminen und Phosphatiden entstandene Phosphorsäure und fanden, wie es aus unseren Versuchen hervorgeht, die Menge derselben so gering, daß man sie übergehen kann.

Beim Vergleich der beiden Methoden war gegen beide gleich viel auszusetzen: die Möglichkeit einer weiteren Oxydation der Purinbasen einerseits, die Verbindung der Phosphorsäure mit organischen Körpern anderseits. Von den Vorteilen der Phosphorsäuremethode war zu erwähnen, daß dieselbe das Endprodukt der Nucleinsäurespaltung darstellt, wogegen die Purinbasen sehr leicht einer weiteren Zersetzung unterliegen können. In einer zweiten Mitteilung werden wir über den Nucleasegehalt verschiedener Organe normaler und thyreodektomierter Tiere berichten, wobei wir uns ebenfalls der zweiten Methode bedienten, d. h. die Nucleasemenge aus der bei der Spaltung erhaltenen Phosphorsäuremenge berechneten. Auf den

---

[1]) Schittenhelm und Wiener, Über das Vorkommen und die Bedeutung von Allantoin im menschlichen Urin. Zeitschr. f. phys. Chem. 1909.

[2]) Iwanoff, Über die Fermentzersetzung der Thymonucleinsäure durch Schimmelpilze. Zeitschr. f. phys. Chem. 39, 1903.

[3]) Sachs, Über die Nuclease. Zeitschr. f. phys. Chem. 46, 1905.

[4]) Brugsch und Schittenhelm, Der Nucleinstoffwechsel und seine Störungen. Jena 1910.

[5]) Araki, Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. Zeitschr. f. phys. Chem. 38, 1903.

[6]) Kikkoji, Über das Vorkommen von einem Nucleinsäurespaltungsferment in Cortinellus edotes. Zeitschr. f. phys. Chem. 1907.

Nucleasegehalt wurden untersucht: Blut und verschiedene Organe des Menschen, des Hundes, des Pferdes, der Kuh, des Kaninchens, des Huhns und des Sandarts.

Das Blut wurde in einer Verdünnung mit Wasser (1:10) angewandt. Die frischen Organe wurden fein zerkleinert und im Laufe von 48 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %ig) extrahiert. Die Organe des Menschen stammten von einem Erhängten, bei dem während der gerichtlich-chemischen Sektion in den Organen nichts Pathologisches gefunden wurde. Diese im luftleeren Raum bei 38° getrockneten Organe wurden fein verrieben und im Laufe von ebenfalls 48 Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert.

10 bis 20 ccm dieser Extrakte, entsprechend 1 bis 2 g Organe, wurden in einem sterilen Kolben mit der gleichen Menge einer 1 %igen Nucleinnatriumlösung versetzt. In wenigen Fällen mußten die Versuche mit 2 bis 5 ccm Extraktlösung angestellt werden, wobei die Berechnungen aber immer 1 g Organ (resp. 10 ccm Extrakt) entsprechen. Die Kontrollversuche wurden mit derselben Menge Extrakt versetzt, gekocht und nach Erkalten die Nucleinnatriumlösung hinzugetan.

Die Versuchs- und Kontrollkolben, versehen mit einigen Tropfen Chloroform und Toluol, wurden auf 40 bis 42 Stunden in einen Thermostat von 37 bis 38° gestellt und öfters geschüttelt. Es erwies sich, daß eine solche Zeitdauer bei Versuchen mit Organen erwachsener Hunde, Pferde, Kühe und Fische erforderlich ist, wogegen bei Versuchen mit Organen des Menschen, der Hühner und junger Hündchen 24 bis 25 Stunden vollständig genügen. Gleich nach der Herausnahme aus dem Thermostat wurde der Inhalt der Kolben in Schalen ausgegossen, in einem Trockenschrank bei 55 bis 65° gut getrocknet und der anorganische Phosphor nach Stutzer-Neumann bestimmt.

In der folgenden Tabelle ist der Gehalt des Gesamtphosphors in 10 ccm meiner Extrakte in Milligramm ausgedrückt:

Organextrakt	Leber	Schilddrüse	Milz	Gehirn	Niere	Blut	Hoden des Hundes	Sandartleber	Sandartkiemen
P_2O_5 . . . . . mg	6,54	2,54	3,8	4,17	2,09	0,14	1,91	7,51	3,55

10 ccm der Nucleinnatriumlösung resp. 0,1 ccm Nucleinnatrium gaben im Durchschnitt 17,4 bis 18,5 mg P_2O_5.

Um uns zu überzeugen, ob es sich nicht um anorganischen Phosphor aus dem nucleinsauren Natrium resp. aus den Nuclease enthaltenden Organen handeln könne, machten wir folgende Versuche:

In 20 ccm Nucleinnatriumlösung konnten nach 48 Stunden langem Stehen im Thermostat bei 38° nach Stutzer-Neumann nur 0,55 bis 0,6 mg P_2O_5 nachgewiesen werden.

Dieselben Versuche mit 0,3 g Nucleoproteid gaben absolut keinen anorganischen Phosphor.

Es erwies sich als zweckmäßiger, die Extrakte mit physiologischer Kochsalzlösung und nicht mit Wasser herzustellen. Einen kurzen Versuch wollen wir hier darstellen:

	P_2O_5-Gehalt in		Zeitdauer
	Leber mg	Schilddrüse mg	
10 ccm Wasserextrakt + 10 ccm 1%iges Nucleinnatrium	15,08	11,91	42 Std. bei 38°
10 ccm physiologisches Kochsalzextrakt + 10 ccm 1%ig. Nucleinnatrium	16,04	13,44	do.

Während wir uns, wie gesagt, für die Phosphorsäurebestimmung entschlossen haben, unternahmen wir zugleich in einigen Versuchen die Purinbasenbestimmung und wollen hier dieselbe kurz schildern:

Aus Leber und Niere des am 25. September durch Blutentnahme getöteten normalen Kaninchens wurden mit physiolog. Kochsalzlösung im Laufe von 24 Std. Extrakte hergestellt (1:10). Zu je 60 ccm dieser Extrakte resp. 6 g Organe wurden am 27. September 0,6 g nucleinsaures Natrium hinzugetan und die Kolben auf 24 Stunden in einen Thermostat gestellt. Außerdem wurden Kontrollkolben angesetzt. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt filtriert und in 10 ccm desselben resp. 1 g Organ und 0,1 g Nucleinnatrium der anorganische Phosphor nach Stutzer bestimmt: Leber 13,06 mg P_2O_5, Niere 11,54 mg P_2O_5.

Die Kontrollkolben enthielten in der Leber 2,15 mg P_2O_5, in der Niere 2,16 mg P_2O_5.

Durch die in 5 g Leber enthaltene Nucleasemenge sind also aus 0,5 g Nucleinnatrium 54,5 mg P_2O_5 abgespalten und durch dieselbe Menge Niere 47,8 mg P_2O_5 abgespalten worden.

Zu dem übrigen, durch Essigsäure von Eiweißstoffen befreiten Filtrat wurde eine wässerige Salzsäurelösung hinzugetan, wobei in den Versuchsfiltraten nur eine sehr geringe Trübung entstand, in den Kontrollfiltraten dagegen aber ein reichlicher flockiger Niederschlag von Nucleinsäure sich schnell absetzte. In beiden Flüssigkeiten wurden die Niederschläge abfiltriert und im Filtrat die Purinbasenbestimmung nach Krüger und Schmidt ausgeführt.

Das Versuchsfiltrat gab folgenden Gehalt an Purinbasenstickstoff: Leber 32,9 mg N, Niere 27,8 mg N.

Das Kontrollfiltrat: Leber 2,5 mg N, Niere 4 mg N.

In der folgenden Tabelle ist die Berechnung auf 10 g Organ und 1 g Nucleinnatrium gemacht:

	P_2O_5-Gehalt			N-Gehalt der Purine		
	Versuch mg	Kontrolle mg	Enzymat. Differenz mg	Versuch mg	Kontrolle mg	Enzymat. Differenz mg
Leber	130,6	21,50	109,1	65,8	5,0	60,8
Niere	115,4	19,8	95,6	55,6	8,0	47,6

Ein zweites Mal wurde die Purinbasenbestimmung in derselben Weise ausgeführt, der Kupferniederschlag aber mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Dieser vom Silber durch Salzsäure befreite Niederschlag gab die den Purinbasen charakteristischen Farbenreaktionen.

Den Einfluß von Alkalien auf die Nucleasewirkung haben wir in folgender Tabelle dargestellt:

	P_2O_5-Gehalt mg	P_2O_5-Gehalt bei Zusatz von 0,2 g Natriumcarbonat mg
10 ccm Leberextrakt + 0,1 g Nucleinnatrium	15,91	8,87
10 ccm Schilddrüsenextrakt + 0,1 g Nucleinnatrium . . .	13,78	2,79

Bei Organextraktion geht im Laufe von 48 Stunden die Hauptmenge der Nuclease in die Lösung über, und nur ein geringer Teil derselben wird im Laufe dieser Zeit nicht extrahiert. In der folgenden Tabelle ist der Nucleasegehalt in den extrahierten und ausgepreßten Organen dargestellt:

	P_2O_5-Gehalt mg
1,2 g Leberrest + 0,1 g Nucleinnatrium	7,6
1,2 g Schilddrüsenrest + 0,1 g Nucleinnatrium	8,24

$^2/_3$ der Nucleasemenge gehen also in das Extrakt über, und $^1/_3$ bleibt in den Organen.

Über den Einfluß der Zeitdauer des Siedens, längeren Stehens im Thermostaten und der Erhaltung der Nucleaseaktivität in den Organen nach dem Tode haben wir folgende Beobachtungen gemacht:

Im Oktober 1909 wurde ein Teil vollständig frischer Pferdeorgane fein verrieben und aus denselben ein Extrakt hergestellt. Der zweite Teil, mit Chloroform und Toluol versehen, wurde in einem sterilen Glase auf 5 Tage an einen kühlen Ort gestellt. Die Schilddrüse dieses Pferdes war nicht normal und zeigte leicht wahrnehmbare, kolloidartig entartete Distrikte.

10 ccm des im Laufe von 24 Stunden hergestellten Extrakts aus dem ersten Teil, versehen mit 0,1 g Nucleinnatrium, wurden auf 42 Stunden in einen Thermostat bei 38° gestellt und 10 ccm desselben Extrakts mit 0,1 g Nucleinnatrium zur Kontrolle gleich in eine Schale ausgegossen und in einem Trockenschrank bei 60° gehalten.

Das aus dem zweiten Teil der Organe nach 5 Tage langem Stehen an einem kalten Ort hergestellte Extrakt wurde in der bekannten Weise, d. h. mit dem Nucleinnatrium versehen, auf 42 Stunden in den Thermostat gestellt; gleichfalls wurden Kontrollkolben angestellt.

Die folgende Tabelle (S. 383) gibt über diese Versuche einen Überblick.

Das Aufbewahren der Organe in der Kälte hemmt die Nucleaseaktivität nur sehr wenig, und deshalb bietet dieses in

den Organen des Menschen und der Tiere sehr verbreitete Ferment ganz besonderes Interesse. In der stromaartig degenerierten Schilddrüse war der Nucleasegehalt bedeutend geringer und entsprach ungefähr der Hälfte des normalen Gehalts.

		P_2O_5-Gehalt in						
		Milz	Leber	Gehirn	Pankreas	Herz	Schilddrüse	Stroma
		mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
Das aus frischen Organen gleich hergestellte Extrakt	vor dem Thermostat	5,68	5,68	5,06	6,96	3,17	3,68	2,16
	nach dem Thermostat	12,47	16,23	8,17	15,50	11,92	11,41	6,09
Das nach 5 Tage langem Stehen hergestellte Extrakt	ungekocht	12,80	16,01	8,29	15,98	11,38	11,80	6,75
	gekocht (Kontrolle)	3,49	3,37	4,67	6,75	4,44	3,68	2,08

In der S. 384 folgenden Tabelle ist der Nucleasegehalt in verschiedenen Organen des Menschen und der Tiere, berechnet auf 10 ccm Extrakt resp. 1 g Organ und 10 ccm einer 1 %igen Nucleinnatriumlösung resp. 0,1 g Nucleinnatrium dargestellt.

In der ersten Reihe ist der Phosphorgehalt der Versuche in Milligramm, in der zweiten derselbe der Kontrollproben und in der dritten die durch die in 1,0 g der Organe enthaltene Nuclease hervorgerufene Differenz dargestellt.

Aus dieser Tabelle geht der Nucleasegehalt des Blutes, des Serums und aller Organe deutlich hervor, wobei der Gehalt derselben in folgender absteigender Reihe sich anordnen läßt: Leber, Niere, Milz, Pankreas und Schilddrüse enthalten bedeutende Mengen, Gehirn, Nebennieren, Lunge und lymphatische Drüsen geringere Mengen, Herz, Blut, Muskel und Serum sind nucleasearm. Das Blut der Hunde, Kaninchen und Rinder ist nucleasereicher als das der Menschen. Die Leber der Menschen, Pferde, Rinder, Kaninchen und des Sanders ist nucleasereicher als die der Hunde. In den meisten Organen junger Hündchen ist der Nucleasegehalt geringer als in denselben bei erwachsenen Tieren. Die Organe des Menschen sind im allgemeinen nucleasereich. Von Wichtigkeit ist die Erhaltbarkeit der Nucleaseaktivität im Laufe längerer Zeit nach dem Tode und deshalb

eine in dieser Richtung erwünschte Untersuchung an Leichen möglich.

	P_2O_5-Gehalt													
	Blut mg	Serum mg	Leber mg	Niere mg	Milz mg	Gehirn mg	Herz mg	Lunge mg	Pankreas mg	Schilddrüse mg	Lymphdrüsen mg	Geschlechtsdrüsen mg	Nebennieren mg	Muskel mg
Mensch	1,42 0,82 0,62		16,48 3,16 13,32	16,48 3,55 12,93		13,01 6,59 6,42		12,8 3,0 9,8						5,28 2,38 2,40
Gut ernährte Hündin	3,08 1,04 2,04		12,68 4,31 8,37	12,75 3,42 9,33	11,0 2,54 8,46		7,53 4,33 3,20	9,38 3,29 6,09		0,5 g 6,09 1,42 4,67			0,5 g 5,19 1,66 3,53	
Schlecht ernährter Hund	3,04 1,65 1,39	2 ccm 3,29 1,14 2,15	11,81 3,17 8,64	15,85 6,34 9,51	13,69 3,04 10,65	11,60 2,28 9,32	8,49 4,43 4,06	7,74 2,22 5,52	14,71 6,50 8,21	0,5 g 7,0 1,8 5,2	9,13 3,92 5,21	9,64 4,31 5,33		
Junger Hund 3 Mon. 10 T.	2,15 0,95 1,20		11,59 3,46 8,13	12,56 3,63 8,93	12,49 2,96 8,53	9,65 2,01 7,64	5,37 3,09 2,28					0,5 g 3,36 1,07 2,29		
Junger Hund 2 Mon. 8 T.	2,12 1,07 1,05		11,08 2,65 8,43	12,74 4,37 8,37	11,02 2,82 8,20	9,98 1,88 8,10	4,57 3,09 1,48			11,37 4,89 6,48		8,17 3,46 4,71		
Pferd		2 ccm 2,98 1,27 1,71	16,19 5,27 10,92		12,89 3,49 9,40	9,29 3,67 5,62	9,28 4,44 4,89		14,98 6,95 8,03	11,89 3,68 8,21				
Kuh	3,08 1,14 1,94		13,75 3,30 10,45	14,33 3,91 10,42	15,33 4,69 10,64	9,87 2,16 7,71				12,55 3,20 9,35	8,62 4,45 4,17		10,91 3,04 7,87	
Kaninchen	2,06 0,81 1,25		13,06 2,54 10,52	11,94 2,54 9,40	13,92 4,94 8,98	8,01 2,41 5,60								5,61 4,31 1,30
Huhn	1,97 0,78 1,19		13,82 3,55 10,27	8,98 2,92 6,06		7,12 4,09 3,03	5,78 3,06 2,72							5,17 3,80 1,37
Sandart			12,68 3,86 8,52				6,34 2,85 3,49	Kiemen 9,0 3,7 6,3				Sperma 6,04 4,5 1,54		

Das Schardinger-Enzym in Milch von euterkranken Kühen.

Von

Richard Reinhardt und Ernst Seibold.

(Aus dem Institut für Seuchenlehre der K. Tierärztl. Hochschule zu Stuttgart.)

(Eingegangen am 20. Februar 1911.)

Milchproben von euterkranken Kühen sind bis jetzt offenbar nur verhältnismäßig wenig mittels des Schardingerschen Reagenses geprüft worden. Koning[1]) hat die Milch von etwa 25 euterkranken Kühen untersucht und ist auf Grund dieser Untersuchungen zu dem Ergebnis gekommen, daß, während die Milch nicht frischmilchender gesunder Kühe normalerweise innerhalb 4 bis 12 Minuten eine Entfärbung des zugesetzten Schardinger-Reagenses herbeiführt, die Milch aus kranken Eutern außerordentlich schnell, manchmal schon innerhalb 1 Minute entfärbt, also eine Zunahme des Enzymgehalts durch die Entzündungsvorgänge erfahren hat. Dabei hat es sich häufig um Kühe gehandelt, bei denen klinisch an dem Euter nichts Abnormes festzustellen, und deren Milch dem Ansehen nach nicht verändert war. Koning meint, daß der erhöhte Enzymgehalt nicht auf pathogene Mastitisbakterien zurückzuführen sei, sondern mit einem veränderten Stoffwechsel der sezernierenden Zellen im Zusammenhang stehe; mit Hilfe der Enzymmethode, d. h. durch Feststellung des Gehalts an Schardinger-Enzym neben der des Katalase- und Diastasegehalts können euterkranke Kühe herausgefunden, ja sogar Beimengungen von Sekret aus entzündeten Eutern in der Handelsmilch nachgewiesen werden.

---

[1]) Biolog. u. biochemische Studien üb. Milch. 2. Heft. Leipzig 1908.

Rievel geht in seinem Handbuch der Milchkunde, 2. Aufl., noch weiter, indem er auf S. 312 sagt: „Reduziert die Milch die Formalin-Methylenblaulösung sehr schnell, so liegt der Verdacht einer Euterentzündung vor, und zwar einer Streptokokkenmastitis."

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Koning ist Sassenhagen[1]) gekommen, der die Milch von 21 mastitiskranken Kühen hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber dem Schardingerschen Reagens untersucht und gefunden hat, daß diese meistens eine Beschleunigung der Reaktion herbeiführt; nur mit einigen Proben erhielt er einen negativen bzw. verzögerten Verlauf der F. M.-Reaktion. Übrigens haben diese Untersuchungen im Wasserbad von 70° stattgefunden und nur bei 5 Kühen auch bei 40°; im letzteren Falle wurden Reaktionszeiten von 4, 3½, 14, 7 und 12 Minuten erzielt.

Zu einem entgegengesetzten Ergebnis kam Schern[2]), der allerdings die Milch von nur einer euterkranken Kuh untersucht hat. In diesem einen Falle hat das Sekret weder bei 45° noch bei 65° entfärbt, und zwar nach der Ansicht Scherns deshalb nicht, weil dem auffallend veränderten Sekret sehr viel bei der Entzündung abgeschiedene Flüssigkeit (Serum) beigemischt war. Zu dieser Annahme gelangte Schern durch die Beobachtung, daß, wenn er normaler Milch verhältnismäßig viel Rinderserum zusetzte, eine der Menge des zugesetzten Serums entsprechende Verzögerung der Reaktion eintrat. Stellte er die Reaktion mit dem flockenreichen, lumigen Bodensatz der Milch an, so entfärbte dieser das Reagens innerhalb 10 Minuten.

Bei der Verschiedenheit der Untersuchungsergebnisse und bei der hohen Bedeutung, die insbesondere von Koning und von Rievel der Feststellung des Gehalts an Schardinger-Enzym für die Eruierung euterkranker Kühe beigemessen wird, hielten wir es für angezeigt, die Sache weiter zu verfolgen. Wir haben deshalb die Milch von 10 euterkranken Kühen auf ihren Reduktasegehalt geprüft. Es handelte sich in allen Fällen um „altmilchende" Kühe; die Untersuchung dieser und die Entnahme der Milch erfolgte am 1. oder 2. Tage nach dem Auftreten offensichtlicher Krankheitserscheinungen. Es wurde in der Regel die dem kranken Euterviertel entnommene Milch und die Mischmilch aus den gesunden Vierteln bzw. aus sämtlichen 4 Vierteln, in einzelnen Fällen auch die Milch jedes einzelnen Euterviertels je für sich untersucht. Wo es möglich war, wurde die Milch nach mehreren Tagen bzw. nach Ablauf der Entzündung einer nochmaligen Untersuchung unterzogen.

---

[1]) Über die biologischen Eigenschaften der Colostral- u. Mastitismilch. Stuttgart 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 18, 274.

Nur beim 10. Fall konnte die Milch auch schon vor Auftreten der Euterentzündung und auch während und nach der Entzündung über eine längere Periode hin untersucht werden. Die Reaktionen wurden stets bei 45° angestellt.

Über die Einzelheiten geben nachstehende kurze Protokollauszüge[1]) Auskunft.

1. Fall.

Kuh O. T. leidet an einer akuten interstitiellen Entzündung des l. h. Euterviertels. Die Milch ist dem Aussehen nach nicht verändert, zeigt amphotere Reaktion; bei der Alkoholprobe fallen feine Gerinnsel aus; Kochprobe ist negativ. Die übrigen 3 Viertel sind gesund; dagegen gerinnt die Milch des r. v. Viertels bei der Alkoholprobe. Die Rahmmenge ist bei der Milch aus jedem der 4 Viertel annähernd gleich.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes: v. r. Viertel entfärbt bei 45° in 8 Min., v. l. Viertel, h. r. Viertel und h. l. Viertel je in 5 Min.

Ergebnis: Die Milch des kranken Viertels entfärbt nicht früher als die der andern Viertel und zeigt dem Schardinger-Reagens gegenüber keine Abweichung von der Milch eines gesunden Euters.

2. Fall.

Kuh H. C. leidet an einer akuten katarrhalischen Entzündung des l. v. Euterviertels. Die Milch aus diesem Viertel ist von weißer Farbe und zeigt gleich nach dem Melken flockige Gerinnsel.

Die Entfärbung des F. M. tritt bei der Milch des kranken Viertels in 3 Min., der Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln in 3½ Min. und der Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln in 4 Min. bei 45° ein.

Bei einer 5 Tage darauf vorgenommenen zweiten Untersuchung entfärben die Milchen in 3, 4 und 5½ Min. Die Entzündungserscheinungen am Euter bestehen noch.

Ergebnis: Das Sekret aus dem kranken Viertel entfärbt etwas rascher als die Mischmilch sämtlicher 4 bzw. der 3 gesunden Viertel und entfärbt namentlich auch in kürzerer Frist, als dies normale Milch zu tun pflegt. Dagegen hält sich die Reaktionszeit der Mischmilch aus allen 4 Vierteln in normalen Grenzen.

3. Fall.

Kuh B. F. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des h. r. Euterviertels. Das Sekret aus diesem Viertel ist gelb und enthält zahlreiche großflockige, gelbe Gerinnsel; nach längerem Stehen scheidet sich über dem sehr voluminösen Bodensatz wenig gelbe, trübe Flüssigkeit ab. Die Milch der übrigen 3 Viertel ist dem Aussehen nach normal.

---

[1]) Die ausführlicheren Protokollauszüge sind in den Monatsheften für prakt. Tierheilk. 23 veröffentlicht, wo wir uns auch über die praktische Bedeutung der Schardinger-Probe für die Erkennung euterkranker Kühe näher ausgelassen haben.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

v. l. Viertel entfärbt in $7^1/_2$ Min., v. r. Viertel in $9^1/_2$, h. l. Viertel und h. r. Viertel je in 6 Min.

Am folgenden Tage entfärbt das Sekret des kranken Viertels innerhalb 3 Min. Das Sekret hatte dieselbe Beschaffenheit und dasselbe Aussehen wie tags zuvor.

20 Tage nach der ersten Untersuchung erscheint das Euter gesund und die Milch von normaler Beschaffenheit. Entfärbung der Mischmilch tritt in 20 Min. ein.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat das veränderte Sekret innerhalb der für gesunde Milch als normal zu bezeichnenden Zeit entfärbt; am folgenden Tage war die Reaktionszeit kürzer als bei gesunder Milch. Nach dem Ausfall der letzten Untersuchung ist zu schließen, daß die Reduktase in dem veränderten Sekret gegen die Höhe der Entzündung zu reichlicher vorhanden war als vor und nach der Erkrankung des Euters.

4. Fall.

Kuh St. Ö. ist an akuter parenchymatöser Entzündung des l. v. Euterviertels erkrankt. Das Sekret aus diesem Viertel ist gelb, wässerig, mit wenigen gelben Flocken untermischt; beim Stehen setzt sich wenig gelbschleimiger Bodensatz ab, darüber ziemlich viel gelbe, seröse Flüssigkeit. Milch der übrigen 3 Viertel ist von normaler Beschaffenheit.

Das kranke Sekret entfärbt F. M. innerhalb 1 Stunde nicht; nur der Bodensatz zeigt sich innerhalb 12 Min. entfärbt. Die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln wird ebenfalls nicht entfärbt, sie zeigt nach 1 Stunde nur eine geringe Aufhellung.

Nach 20 Tagen zeigt sich das Euter vollständig gesund und die Milch von normaler Beschaffenheit. Auch jetzt zeigt die Mischmilch aus allen 4 Vierteln nach 1 Stunde nur eine ganz minimale Aufhellung.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat weder das kranke Sekret noch die Mischmilch der 3 gesunden Viertel entfärbt; auch bei der zweiten Untersuchung ist keine Entfärbung der Mischmilch eingetreten. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Milch dieser Kuh zur Zeit der Untersuchung überhaupt nur wenig Enzym enthalten hat. Vorstehender Fall dürfte den Ausnahmefällen einzureihen sein, bei denen auch die gesunde Milch die Schardinger-Reaktion nicht gibt und die von uns in einer früheren Abhandlung in dieser Zeitschrift mehrfach beschrieben sind.

5. Fall.

Kuh Sch. O. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des r. v. Euterviertels. Das Sekret dieses Viertels ist von gelber Farbe, wässeriger Beschaffenheit und mit gelben, flockigen Gerinnseln untermischt; die Milch aus den 3 anderen Vierteln ist normal.

Weder das Sekret des v. r., noch des h. r., noch die Mischmilch der beiden h. Viertel entfärben F. M. innerhalb 1 Stunde.

Ergebnis: Dieser Fall dürfte wie der 4. Fall zu beurteilen sein.

6. Fall.

Kuh Sohl. G. ist mit einer chronischen parenchymatösen Entzündung des r. h. Euterviertels behaftet; im r. v. Viertel lassen sich einige haselnußgroße derbe Knoten feststellen. Das Sekret des r. Hinterviertels ist gelb, wässerig und enthält wenige gelbe Flocken; das Sekret des r. Vorderviertels ist gelbweiß mit feinen weißen Gerinnseln. Das Sekret aus den beiden r. Eutervierteln reagiert alkalisch, die Milch der beiden l. Viertel, die normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, amphoter.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

Das	Sekret	des	h. r. V.	entfärbt	innerhalb 1 Stunde nicht.	
„	„	„	h. l. V.	„	nach 6 Min.	
„	„	„	v. r. V.	„	„ 10	„
„	„	„	v. l. V.	„	„ $6^1/_2$	„

Mischmilch zu gleichen Teilen aus allen 4 Vierteln entfärbt nach 6 Min.

Ergebnis: Das veränderte Sekret des r. v. Viertels und die Milch der beiden linken Viertel entfärben innerhalb der Zeit gesunder Milch. Das Sekret des r. Hinterviertels, das wässerig war und fast ausschließlich aus Serum bestand, entfärbte innerhalb 1 Stunde nicht. Bei Mischmilch verschwand der Unterschied in der Reaktion der einzelnen Milchproben so sehr, daß Entfärbung innerhalb der normalen Zeit eintrat.

7. Fall.

Kuh K. G. leidet an einer akuten parenchymatösen Entzündung des r. v. Euterviertels. Das r. Hinterviertel ist verödet. Das Sekret des r. v. Viertels ist gelb, wässerig, mit feinen, gelben Gerinnseln. Der Bodensatz beträgt etwa ein Viertel des ganzen Sekrets.

Das Sekret des kranken Viertels entfärbt F. M. in $10^1/_2$ Min., die zusammengemolkene Milch der beiden gesunden Viertel in $6^1/_2$ Min. Nach 7 Tagen sind die Entzündungserscheinungen nur wenig zurückgegangen. Das Sekret des r. v. Viertels entfärbt in 10 Min., das der gesunden Viertel in 5 Min.

Ergebnis: Obwohl das Sekret des kranken r. v. Viertels sehr stark vermindert ist, tritt doch Entfärbung innerhalb der Norm ein. Das Sekret aus den gesunden Vierteln entfärbt rascher als das aus dem kranken.

8. Fall.

Kuh B. II F. leidet an akuter, parenchymatöser Entzündung des v. l. Euterviertels. Das Sekret ist gelb, wässerig, mit großen, gelben Flocken vermischt; der Bodensatz beträgt ein Drittel des Sekrets; die Flüssigkeit darüber ist gelb und trüb. Die Milch aus den 3 anderen Eutervierteln erscheint normal.

Bei Zusatz von F. M. entfärbt das kranke Sekret erst in 1 Stunde 43 Min., während das Gerinnsel (Bodensatz) bereits nach 10 Min. seine ursprüngliche gelbe Farbe angenommen hat; die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln entfärbt nach 7 Min.

Nach 4 Tagen sind die Entzündungserscheinungen wesentlich zurückgegangen; das kranke Sekret ist rötlichgrau und enthält feine, graugelbe Gerinnsel; der Bodensatz beträgt etwa ein Viertel des Sekrets; die Flüssigkeit darüber ist grauweiß und besitzt eine reichliche Rahmschicht. Die Reaktionszeit des kranken Sekrets auf F. M. beträgt $3^1/_2$ Min., die der gesunden Mischmilch 8 Min.

Nach weiteren 5 Tagen sind die Entzündungserscheinungen am Euter nahezu verschwunden, das kranke Sekret ist von gelber Farbe, colostrumähnlich; nach dem Zentrifugieren zeigt sich ein gelber, schleimiger Bodensatz, der etwa ein Viertel des Sekrets ausmacht; die darüber stehende Flüssigkeit ist graugelb und besitzt eine Rahmschicht. Das kranke Sekret entfärbt F. M. in $3^1/_2$ Min., die gesunde Mischmilch in 7 Min., die Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln in 5 Min.

5 Tage nach der letzten Untersuchung sind die Entzündungserscheinungen vollständig zurückgegangen. Das Sekret des kranken Viertels ist von milchiger Beschaffenheit und von gelber Farbe; beim Zentrifugieren erhält man einen aus Zellen bestehenden Bodensatz, der etwa $^1/_{10}$ des Sekrets ausmacht. Die Milch der übrigen Viertel ist normal und weiß. Letztere entfärbt in 7 Min., das Sekret des kranken Viertels in 4 Min.

Ergebnis: Bei der ersten Untersuchung hat das stark veränderte Sekret des kranken Viertels erst in 1 Std. 43 Min. entfärbt. Nach Rückgang der Entzündungserscheinungen entfärbt das kranke Sekret früher als gesunde Milch. Die Milch aus den gesunden Vierteln hat stets innerhalb der normalen Zeit entfärbt.

9. Fall.

Kuh W. G. ist an einer akuten, parenchymatösen Entzündung des v. l. Euterviertels erkrankt und ist außerdem noch mit Euterpocken behaftet. Das Sekret des erkrankten Viertels ist von gelber Farbe, enthält zahlreiche Eiterklümpchen und ist höchst übelriechend; der Bodensatz verhält sich zu der darüberstehenden, gelben, wässerigen Flüssigkeit wie 2:1. Die Milch aus den übrigen 3 Vierteln erscheint normal.

Das zugesetzte F. M. wird von dem Sekret des v. r., des h. r. und des h. l. Viertels und ebenso von der Mischmilch aus diesen 3 Vierteln nach 1 Stunde nur aufgehellt, von dem des v. l. Viertels nach 7 Minuten und von der Mischmilch aus sämtlichen 4 Vierteln nach 14 Minuten entfärbt; bei der Entnahme und Untersuchung der Milch am folgenden Tag entfärbt das Sekret des kranken Viertels in 10 Minuten und die Mischmilch aus allen 4 Vierteln in 18 Minuten, während die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln nicht entfärbt.

Am nächstfolgenden Tage war das Verhältnis ein ähnliches; die kranke Milch entfärbte nach 7 Minuten, die Mischmilch aus allen 4 Vierteln nach 10 Minuten, und die Mischmilch aus den 3 gesunden Vierteln brachte während 1 Stunde nur eine geringe Aufhellung zustande.

Am 13. Tage nach der ersten Untersuchung ist der Befund am Euter noch derselbe; aus dem kranken Euterviertel lassen sich jedoch

nur einige Kubikzentimeter dicken, gelben, stinkenden Sekrets ausmelken. Die Mischmilch aus den 3 gesunden Eutervierteln entfärbt nach 31 Minuten, 9,5 ccm dieser Mischmilch + 0,5 ccm krankes Sekret entfärben nach 17 Minuten.

Ergebnis. Das Sekret aus dem kranken Viertel hat bei allen Untersuchungen das Schardinger-Enzym reichlicher enthalten als die Milch aus den gesunden Vierteln; es war jedoch in dem kranken Sekret nur in solcher Menge vorhanden, daß die Reduktionszeit von der gesunden Milch nicht abgewichen ist. Die Milch aus den gesunden Vierteln hat nicht entfärbt. Die dritte Untersuchung zeigt indes, daß solche Milch durch die Beimengung von krankem Sekret derart beeinflußt werden kann, daß die Mischmilch eine normale Reaktionszeit liefert.

10. Fall.

Kuh S. J. ist mit Lungentuberkulose behaftet; das Euter ist gesund; der Milchertrag ist gering (2 l pro die); die Milch selbst ist von normaler Beschaffenheit und wird während 14 Tagen durch tägliche Untersuchungen auf ihr Verhalten gegenüber dem Schardinger-Reagens geprüft. Die Reduktionszeit schwankt zwischen 7 und 24 Minuten, der Durchschnitt beträgt zwischen 16 und 17 Minuten.

Am 14. XI. 1910 zeigt sich eine diffuse Schwellung der beiden hinteren Euterviertel, am 15. XI. des ganzen Euters; am 18. XI. hat sich der Prozeß auf das l. v. Viertel lokalisiert, das eine akute parenchymatöse Entzündung aufweist, die am 13. XII. noch vorhanden ist. Die Mischmilch, die anfangs normale Farbe, feine Gerinnsel und bei der Alkoholprobe starke Gerinnung gezeigt hat, weist vom 16. XI. ab gelbe Farbe auf und ist colostrumähnlich. Am 18. XI. zeigt sie wieder mehr eine weiße Farbe; wird aber bei der Alkoholprobe ausgeflockt, während das Sekret des kranken Viertels gelb, wässerig und mit reichlichen gelbweißen Flocken vermischt ist. Allmählich liefert das v. l. Viertel nur noch einige Kubikzentimeter bald wässerigen, bald mehr dickeren Sekretes.

Das Verhalten gegenüber F. M. ist folgendes:

Am 14. XI. entfärbt die Mischmilch in 5 Min., am 15. XI. in 6 Min., am 16. XI. in $5^1/_2$ Min., am 17. XI. in 8 Min., am 18. XI. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel in 35 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + 1 ccm krankes Sekret entfärben in 21 Min., am 19. XI. bis 5. XII. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel zwischen 11 und 23 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + 1 ccm krankes Sekret entfärben zwischen 6 und 19 Min., am 13. XII. entfärbt die Mischmilch der 3 gesunden Viertel in 40 Min., 9 ccm Mischmilch der 3 gesunden Viertel + $^1/_2$ ccm krankes Sekret entfärben in 31 Min.

Ergebnis. Zunächst geht aus vorstehenden Untersuchungen hervor, daß die Milch einer altmilchenden Kuh, auch wenn das Euter gesund ist, das Schardinger-Reagens nicht immer innerhalb der als Norm angegebenen Zeit von 4 bis 12 Minuten entfärbt; denn die durchschnittliche Reaktionszeit hat hier zwischen 16 und 17 Minuten betragen. Unmittelbar nach Einsetzen der Euterentzündung war die Reduktionszeit

der Mischmilch kürzer, sie hat 5 Minuten betragen, hat sich aber immer noch in normalen Grenzen gehalten. Später zeigte die Mischmilch aus 3 Vierteln (ohne das Sekret des l. v. Viertels) eine ziemlich lange Reduktionszeit, die stets verkürzt wurde, wenn der Mischmilch aus den 3 Vierteln noch Sekret aus dem stark entzündeten l. v. Viertel zugesetzt wurde; es hat also das stark veränderte Sekret des v. l. Viertels einen größeren Gehalt an Reduktase gehabt als die makroskopisch nicht veränderte Milch der 3 andern Viertel. Im übrigen war der Enzymgehalt der Milch dieses Euters großen Schwankungen unterworfen.

Zusammenfassend haben wir zu bemerken, daß insgesamt 7 Fälle von akuter parenchymatöser Euterentzündung und je 1 Fall von akuter interstitieller, von akuter katarrhalischer und von chronischer parenchymatöser Mastitis zur Untersuchung gelangt sind.

Wir möchten gleich vorausschicken, daß die klinischen Erscheinungen am Euter und die Art der Euterentzündung nicht von entscheidendem Einfluß auf die Art und Weise des Ablaufs der Reaktion sind. Größere Bedeutung in dieser Beziehung kommt der Ausdehnung, dem Grade und dem Stadium der Entzündung und insbesondere der mehr oder weniger starken, meist von der Art, dem Grade und dem Stadium der Entzündung abhängigen Veränderung des Sekretes zu.

So sehen wir, daß bei Euterentzündungen, wo die Milch keine physikalischen Veränderungen aufweist, der Gehalt an Reduktase auch keine Abweichung von der Norm zeigt (siehe 1. Fall), obwohl das Euter selbst auffallend entzündet ist. Solche Verhältnisse trifft man häufig im Anfangsstadium einer Euterentzündung, und bei einer interstitiellen Mastititis eher und länger an als bei den übrigen Arten von Mastitiden.

In anderen Fällen, wo die Milch des erkrankten Viertels zwar noch die normale Farbe, aber beim Melken schon feine Gerinnsel zeigt, kann das Enzym bald vermehrt sein (2. Fall), bald innerhalb der Norm sich halten (6. und 10. Fall). Die Milch hat im 2. Falle in 3 Minuten entfärbt, während die Reaktionszeit beim 6. und 10. Fall 10 und 5 bzw. 6 Minuten (Untersuchung vom 14. und 15. XI.) betragen hat.

Beim 3. Fall (2. Untersuchung) trat Entfärbung schon nach 3 Minuten, also rascher als normal ein, obwohl das Sekret stark verändert war; es war sehr flockenreich, schied aber nur wenig Flüssigkeit ab. Die Entzündung war hier offenbar noch

im Zunehmen begriffen, sie hatte ihren Höhepunkt noch nicht erreicht.

Eine Beschleunigung der Reaktion konnten wir außer bei dem schon erwähnten 2. und 3. Fall auch beim 8. Fall (2. und 3. Untersuchung) feststellen, wo die Entfärbung des Sekretes schon je in $3^1/_2$ Minuten eingetreten ist. In diesem Falle hatte die Euterentzündung ihren Höhepunkt schon überschritten, die Entzündung war bereits im Abklingen und das Sekret näherte sich schon wieder mehr der normalen Beschaffenheit.

Bei auffallend stark verändertem Sekret, insbesondere bei solchem, das gelblich, serös-wässerig, und wo der Bodensatz geringer war als die darüber stehende Flüssigkeit, war bald eine Verzögerung der Reaktion (8. Fall, 1. Untersuchung), bald ein völliges Ausbleiben derselben festzustellen (6. Fall). So hatte beim 8. Fall das stark veränderte Sekret erst nach 1 Stunde und 43 Minuten entfärbt, und im 6. Fall war durch das kranke Sekret überhaupt keine Entfärbung erzielt worden.

Die Fälle 4 und 5 müssen für unsere Beurteilung außer Betracht bleiben, da es sich hier zweifellos um abnorme, den Ausnahmefällen zuzurechnende Milchen, die überhaupt nur wenig Schardinger-Enzym enthalten, gehandelt hat. Auch der 10. Fall ist nicht geeignet, aus ihm einwandfreie Schlüsse abzuleiten, da die Milch der betreffenden Kuh sowohl vor als während der Euterentzündung als nach Ablauf des akuten Entzündungsanfalls große Schwankungen in der Reduktionszeit aufzuweisen gehabt hat. Doch läßt sich so viel sagen, daß das entzündete Viertel ein reduktasereicheres Sekret lieferte als die übrigen Viertel.

Aus obigen Ausführungen geht hervor, daß der Reduktasegehalt der Mastitismilch in erster Linie von dem Grade der Veränderung des Sekrets, weiterhin von dem Grade und dem jeweiligen Stande der Euterentzündung und in letzter Linie von der Art und Ursache der Eutererkrankung abhängig ist. So können wir im Anfangsstadium einer Euterentzündung, wo das Sekret noch normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, oft eine völlig normale Reaktionszeit oder eine beschleunigte Entfärbung beobachten. Derart schnell eintretende Reaktionen, wie sie von Koning und Rievel angegeben werden, nach denen die Entfärbung des kranken Sekrets innerhalb 1 Minute

erfolgen soll, haben wir bei unseren Fällen nie angetroffen. Auch zu der Zeit, wo die Entzündung wieder im Zurückgehen begriffen ist und wo das Aussehen des Sekrets dem normaler Milch sich nähert, treffen wir normale oder beschleunigte Reaktion an. Auf der Höhe der Entzündung, wo das Sekret gelb und stark serös-wässerig ist, ist meistens eine Verzögerung im Ablauf der Reaktion festzustellen oder bleibt die Reaktion ganz aus.

Die wesentlichste Veränderung der Schardinger-Reaktion, nämlich eine Verzögerung oder ein Ausbleiben derselben, tritt also auf der Höhe der Euterentzündung ein. Das ist aber zu einer Zeit, wo man am Euter und an der Milch selbst so auffallende Veränderungen hat, daß man auf jedes weitere Hilfsmittel zur Erkennung der Erkrankung, also auch auf die Schardinger-Reaktion, verzichten kann; zudem ist dieses Hilfsmittel keineswegs ganz zuverlässig; denn es ist ja auch einmal bei normaler Milch aus gesundem Euter eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion anzutreffen. Bei dieser Sachlage müssen wir bestreiten, daß der Schardingerschen Probe in der praktischen Milchkontrolle zum Nachweis von Euterentzündungen eine so hohe Bedeutung zukommt, wie sie ihr von einzelnen Autoren zugeschrieben wird.

Was die Verwertung der Schardinger-Reaktion zur Erkennung von Euterentzündungen im Anfangsstadium, zu einer Zeit, wo die Milch noch normales Aussehen hat und das Euter noch keine klinischen Erscheinungen aufweist, anlangt, so haben wir oben gesehen, daß in solchen Fällen die Milch innerhalb der normalen Zeit entfärbt oder eine kürzere Reaktionszeit aufweist. In letzterem Falle ist aber zu bedenken, daß bei dieser Sachlage stets Mischmilch aus allen 4 Vierteln oder sogar die Sammelmilch einer Mehrzahl von Kühen zur Untersuchung kommt, ein Umstand, durch den die an und für sich nicht sehr bedeutende Abweichung der Reaktionszeit der Milch von der Norm verwischt wird; denn wie die 2. Untersuchung des Falles 2 und die 3. Untersuchung des Falles 7 zeigen, kann sich, auch wenn die Milch des kranken Viertels abnorm rasch entfärbt, die Reaktionszeit der Mischmilch aus allen 4 Vierteln doch in normalen Grenzen halten. Ganz ähnliche Verhältnisse

liegen vor, wenn die Euterentzündung ihren Höhepunkt überschritten hat und im Abnehmen begriffen ist. Es lassen sich also mit Hilfe der Schardingerschen Probe Euterentzündungen in den erwähnten Stadien ebenfalls nicht, und ebensowenig eine Streptokokkenmastitis als solche erkennen.

Im übrigen möchten wir hier noch einmal besonders darauf hinweisen, daß nach unseren Versuchen der Einfluß einer Euterentzündung auf den Reduktasegehalt der Milch ein sehr wechselnder ist und daß Mastitismilch außerordentlich großen Schwankungen bezüglich ihres Verhaltens gegen das Schardinger-Reagens unterworfen ist.

Es wäre noch die Frage zu erörtern, in welcher Weise wohl die bei der Euterentzündung sich abspielenden Vorgänge den Reduktasegehalt beeinflussen. Die Veränderung des Gehalts an Schardinger-Enzym, die wir im Verlaufe einer Mastitis beobachten, läßt sich vielleicht so erklären, daß nicht zu heftige, das Euter treffende Läsionen für die sezernierenden Zellen als Reiz wirken und sie zu vermehrter Produktion von Enzymen, speziell auch der Reduktase, anstacheln. Wir treffen deshalb in diesem Zeitpunkt (Anfangsstadium der Euterentzündung) ein rasches, zuweilen ein abnorm rasches Eintreten der Reaktion. Handelt es sich um sehr heftige Euterentzündungen, so wird früher oder später eine Lähmung oder Vernichtung der betroffenen Zellen eintreten; die Produktion von Reduktase ist herabgesetzt oder hört ganz auf; gleichzeitig mischen sich dem Sekret Entzündungsprodukte, Blutbestandteile (Serum, Leukocyten usw.) bei. Die Folge ist eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion (Kulminationspunkt der Euterentzündung). Erst wenn die Entzündung ihren Höhepunkt überschritten hat und der Prozeß der Heilung sich zuwendet, erholen sich die Zellen wieder bzw. treten an Stelle der zugrunde gegangenen Zellen neue; es wird wieder Reduktase abgeschieden, und die Milch erlangt nach kürzerer oder längerer Zeit ihren früheren Gehalt an Schardinger-Enzym wieder oder weist sogar einen höheren Enzymgehalt gegen früher auf (Stadium der Heilung). Ob diese Auffassung richtig ist und wie groß der Anteil an der Veränderung der Reaktion ist, der dem durch die Entzündung veranlaßten Übertritt von Blutbestandteilen in die Milch zukommt, müssen wir vorerst noch dahingestellt sein lassen.

Aus unseren Ausführungen ergeben sich nachstehende

Schlußfolgerungen:

1. Das Auftreten einer Euterentzündung beeinflußt den Gehalt der Milch an Schardinger-Enzym.

2. Der Enzymgehalt ist in erster Linie von dem Grade der Veränderung des Sekrets, sowie von der Ausdehnung, dem Grade und dem Stadium der Entzündung abhängig.

3. Solange das Mastitissekret normale Farbe und Beschaffenheit zeigt, pflegt die Reaktionszeit normal oder verkürzt zu sein.

4. Bei sehr starker Veränderung, insbesondere bei serös-wässeriger Beschaffenheit des Sekrets ist eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Reaktion festzustellen.

5. Mastitismilch zeigt große Schwankungen im Enzymgehalt.

6. Die Schardingersche Probe eignet sich nicht zur Ermittlung euterkranker Kühe.

Über die Hitzekoagulation der Proteine.

I. Mitteilung.

Wird die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung durch die Koagulation geändert?[1])

Von

S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen.

(Aus dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 22. Februar 1911.)

Bei biologisch-chemischen Untersuchungen liegt oft die Aufgabe vor, die koagulablen Proteine aus einer Lösung zu entfernen. Das herkömmliche Verfahren in solchen Fällen ist, wie bekannt, durch Erhitzen der mit einer reichlichen Menge eines angemessenen Salzes versetzten, ganz schwach sauren Lösung den genuinen Proteinstoff in koagulierter Form auszuscheiden. Es handelt sich indessen gewöhnlich um den Nachweis oder vielleicht gar um die quantitative Bestimmung nicht koagulabler Körper, deren nähere Untersuchung erst durch das Wegschaffen des genuinen Proteins ermöglicht wird, und selbstverständlich ist daher ein Zusatz von fremden Stoffen, z. B. Salzen, beim Koagulationsprozesse soweit als möglich zu vermeiden. Andererseits ist es eine altbekannte Sache, daß salzfreie oder salzarme Proteinlösungen nicht zu vollständiger Koagulation gebracht werden können, wenn nicht der richtige Grad von Säuerung ganz genau getroffen wird.

Die von L. Michaelis und P. Rona[2]) vorgeschlagene Ausfällung von genuinen Proteinstoffen durch Mastix oder andere kolloidale Stoffe

[1]) Wird gleichzeitig in französischer Sprache in den Compt. rend. du Lab. de Carlsberg 10, 1, 1911 veröffentlicht.

[2]) Diese Zeitschr. 2, 219, 1906; 3, 109, 1906; 4, 11, 1907; 5, 365, 1907; 6, 1, 1907; 7, 329 und 488, 1907; 8, 356, 1908.

ist daher als ein wesentlicher Fortschritt zu verzeichnen und leistet auch in vielen Fällen gute Dienste, besonders wenn Cupriacetat, dessen Metall nachher mittels Schwefelwasserstoff entfernt werden kann, als Elektrolyt benutzt wird. Immerhin kann es aber doch kaum zweifelhaft sein, daß das natürlichste Verfahren, koagulable Proteinstoffe wegzuschaffen, eine Koagulation sein muß, wenn es nur gelingt, eine solche Operation ohne Zugabe wesentlicher Mengen von Salzen oder anderen Fremdkörpern in zufriedenstellender Weise durchzuführen. Es werden nämlich dadurch wahrscheinlich nur die wirklich koagulierbaren Stoffe ausgeschieden werden, während eine jegliche Fällungsmethode, auch die von Michaelis und Rona vorgeschlagene, es kaum vermeidet, nicht koagulierbare Körper zusammen mit den koagulierbaren zu fällen.

Ausgehend von derartigen Betrachtungen und im Anschluß an verwandte, hier im Laboratorium ausgeführte Arbeiten, fingen wir vor ein paar Jahren eine Untersuchung über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration beim Koagulierungsprozesse an. Es hat sich dabei in guter Übereinstimmung mit dem oben Angeführten herausgestellt, daß es, um eine vollständige Koagulation zu erhalten, von der allergrößten Bedeutung war, die Wasserstoffionenkonzentration der betreffenden Lösung innerhalb recht eng bemessener Grenzen zu halten, und zwar besonders, wenn die Lösung arm an Salz war. Zu gleicher Zeit hat es sich aber auch gezeigt, daß es möglich ist, eine ebenso vollständige, ja gar noch vollständigere — oder jedenfalls eine schnellere — Koagulation ohne Salzzugabe als mit derselben zu erreichen, wenn man nur dafür Sorge trug, bei der optimalen Wasserstoffionenkonzentration zu arbeiten. Diese letztgenannte Größe hat, wenn die sonstigen Versuchsbedingungen (Konzentration der Proteinlösung, Salzgehalt derselben, Koagulationsdauer) konstant gehalten werden, einen konstanten Wert, der von der Art und Beschaffenheit der für die Säuerung angewandten Säure unabhängig ist. Bei den von uns gewöhnlich benutzten Versuchsbedingungen entspricht die optimale Wasserstoffionenkonzentration, sowohl was Blutserum, als auch was Eiereiweiß betrifft (die einzigen zwei Proteinstofflösungen, mit denen wir bisher gearbeitet haben), dem Wasserstoffionenexponenten $p_{H^{\cdot}}$ = ca. 4,7[1]). Von einem absolut konstanten Wert für die optimale Wasserstoffionenkonzentration des Koagulationsprozesses kann jedoch nicht die Rede sein, indem dieser, wie im experimentellen Teil (siehe S. 419 und S. 431) näher besprochen wird, sowohl von der Konzentration des Proteinstoffes als auch vom Salzgehalt der Lösung abhängt.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration in genauem Zusammenhang steht mit dem sogenannten „isoelektrischen Punkt“ der Proteinstoffe, über dessen Bedeutung und Lage eine Reihe in den letzten zwei Jahren veröffentlichter Arbeiten von L. Michaelis, P. Rona, B. Mostynski und H. David-

[1]) Betreffs der Bedeutung der Größe $p_{H^{\cdot}}$ verweisen wir auf diese Zeitschr. 21, 159, 1909.

sohn[1]) neue und wichtige Aufschlüsse gebracht haben. Nach den von Michaelis und Rona geäußerten Anschauungen über das Wesen des Koagulationsprozesses muß man erwarten, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation mit derjenigen Wasserstoffionenkonzentration zusammenfalle, die dem isoelektrischen Punkte des betreffenden Proteinstoffes entspricht. Die von uns erhaltenen Resultate scheinen nicht ganz diese Auffassung zu bestätigen. Während nämlich der „isoelektrische Punkt" laut der theoretischen Begründung Michaelis'[2]) eine konstante Größe sein muß, so ist nach den Ergebnissen unserer Versuche die Optimal-Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation, wie schon oben gesagt, sowohl von der Konzentration der Proteinstofflösung als auch von ihrem Salzgehalt abhängig. Unsere Versuchsresultate stimmen zunächst mit der von W. Pauli und R. Wagner[3]) jüngst vertretenen Betrachtungsweise überein, laut der die Bestimmung der optimalen Koagulationsbedingungen von Michaelis und seinen Mitarbeitern hauptsächlich auf eine Neutralisation anwesender alkalischer Stoffe hinausläuft. Auch unsere Versuche haben nämlich zu einer ähnlichen Auffassung geführt, indem wir, wie es im experimentellen Teil (S. 428) näher dargetan wird, Grund haben, anzunehmen, daß die für die Koagulation einer reinen Proteinlösung optimale Wasserstoffionenkonzentration im wesentlichen von dem dem Proteinstoff eigenen sauren Charakter herrührt und deshalb von der Proteinkonzentration abhängig sein muß.

Mit der Frage nach der für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration eng verknüpft steht der Hauptgegenstand dieser Abhandlung, die Frage nach der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation. Diese Frage ist unseres Wissens früher nicht genau untersucht worden; es ist aber eine landläufige Annahme, daß die Reaktion der Lösung während der Koagulation gegen die alkalische Seite hin verschoben wird. In dem bekannten Buche O. Cohnheims: „Chemie der Eiweißkörper" (1904) wird dieses Verhältnis in den folgenden Worten erwähnt (S. 132): „Beim Koagulieren einer beliebigen Eiweißlösung, die irgendwelche Salze, Säuren oder Basen enthält, verschiebt sich die Reaktion nach der alkalischen Seite, so daß eine neutrale oder selbst schwach saure Lösung beim Kochen deutlich alkalisch wird. Der Grund ist unbekannt." Im Gegensatz hierzu

---

[1]) Diese Zeitschr. 19, 181, 1909; 24, 79, 1910; 25, 401, 1910; 27, 38, 1910; 28, 1 und 193, 1910; 29, 494, 1910 und 30, 143, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 19, 184, 1909 und 24, 80, 1910.

[3]) Diese Zeitschr. 27, 300, 1910.

meinen Michaelis und Rona[1]), daß bei der Koagulation von Serum, unter gebührender Rücksicht der anwesenden Kohlensäure, keine Reaktionsänderung stattfindet: „Beim Denaturieren des Serums durch Hitze mit oder ohne Gerinnung ändert sich, wenn man die Austreibung von CO_2 verhindert, die nach dem Erkalten bestimmte Reaktion nicht, und ebenso wenig das Säurebindungsvermögen des Serums" (l. c. S. 339). Aus dem Zahlenmaterial Michaelis und Ronas geht indessen hervor, daß sie nur in einem einzigen Falle die Koagulation bei einer in der Nähe der optimalen liegenden Wasserstoffionenkonzentration vorgenommen haben; bei diesem Versuch (Nr. 1, S. 336) haben sie übrigens eine ausgeprägte Reaktionsänderung in alkalischer Richtung erhalten. In allen übrigen Versuchen, wo die Wasserstoffionenkonzentration Erwähnung findet, ist die Reaktion schwach alkalisch gewesen; unter solchen Umständen wird aber die Koagulation jedenfalls nur unvollständig sein, und daneben werden unzweifelhaft mehr oder weniger tiefgreifende Spaltungen des Proteinstoffes während des Erhitzens vor sich gehen.

Wünscht man zuverlässige Auskünfte über die hier behandelte Frage zu bekommen, dann muß man die Koagulation in solcher Weise vorgehen lassen, daß die Ausscheidung möglichst vollständig wird; das heißt zunächst, daß die Wasserstoffionenkonzentration die optimale sein muß. Einige in dieser Weise teils mit Serum und teils mit Eiereiweiß ausgeführte Versuchsreihen bilden den Hauptinhalt dieser Abhandlung. Wie im experimentellen Teil genauer erwähnt wird, haben wir für jede einzelne Versuchsreihe erst durch Vorversuche ermittelt, welche Menge der angewandten Säuren (Salzsäure, Milchsäure, Essigsäure oder Schwefelsäure) bei den gewählten Versuchsbedingungen (Proteinkonzentration, Salzgehalt usw.) erforderlich war, um der zu koagulierenden Flüssigkeit die optimale Wasserstoffionenkonzentration zu erteilen. Beim Hauptversuch wurde die Koagulation dann eben unter den optimalen Bedingungen vorgenommen und die Wasserstoffionenkonzentration sowohl vor als auch nach der Koagulation gemessen.

---

[1]) Diese Zeitschr. 18, 336, 1909.

Es hat sich bei diesen Versuchen herausgestellt, daß die Hitzekoagulation des Proteins immer mit einer Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung verbunden ist.

Außerdem hat sich ergeben, daß die Größe der Wasserstoffionenkonzentrationsänderung von der angewandten Säure abhängig ist; im großen und ganzen ist die Änderung um so größer, je stärker die benutzte Säure ist.

Wie im experimentellen Teil ausführlich besprochen werden wird, finden diese Verhältnisse eine einfache und ungezwungene Erklärung durch die oben angeführte Auffassung der Optimal-Wasserstoffionenkonzentration als derjenigen Konzentration der Wasserstoffionen, die der reine Proteinstoff der Lösung mitteilt. Die Reaktionsverschiebung wird demnach einfacherweise als ein Ausschlag der Änderung der Proteinkonzentration der Lösung aufzufassen sein. (Siehe übrigens S. 428.)

Im folgenden experimentellen Teil beschreiben wir unter Abschnitt A einige Versuchsreihen, die das Verfahren zeigen, das von uns befolgt wurde, um die für die Koagulation der Serum- und der Eiereiweißlösung optimalen Bedingungen festzulegen.

Im Abschnitt B wird die Frage nach der Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation behandelt.

Schließlich erwähnen wir im Abschnitt C ein sonderbares und unseres Wissens bisher noch nicht beobachtetes Verhalten bei der Hitzekoagulation einer Eiweißlösung, und teilen einige diesbezügliche Versuchsreihen mit. Während das Serum schon nach $^1/_4$ bis $^1/_2$stündigem Erhitzen in siedendem Wasser vollständig auskoaguliert ist, so verhalten sich Eiweißlösungen, selbst unter den günstigsten Koagulationsbedingungen, ganz anders. Wenn man, nachdem die erste, reichliche Koagulation stattgefunden hat, fortfährt, die Flüssigkeit mit dem Gerinnsel weiter zu erhitzen, so scheidet sich allmählich mehr und mehr aus, bis das Maximum im Laufe einiger Stunden erreicht wird, wonach die spaltende und lösende Wirkung der Flüssigkeit auf das Gerinnsel dermaßen überhand nimmt, daß die Menge der

nicht koagulierten Stickstoffkörper bei weiterem Erhitzen wieder zunimmt. Wird dagegen das bei $^1/_2$stündigem Erhitzen in siedendem Wasser gebildete Gerinnsel abfiltriert, so bleibt das Filtrat bei nochmaliger Erwärmung vollständig oder doch so gut wie vollständig klar.

A. Die optimalen Koagulationsbedingungen.

Eines der Probleme, für deren Lösung eine wirklich unanfechtbare Methode zur Wegschaffung koagulabler Proteine von der allergrößten Bedeutung sein wird, ist die Frage nach dem „Reststickstoff des Blutes". Diese Frage, deren richtige Beantwortung unter anderem für das Verständnis der ganzen Stickstoffumsetzung im Organismus ausschlaggebend ist, ist Gegenstand sehr vieler Untersuchungen gewesen; die erhaltenen Ergebnisse widersprechen sich aber oft. Das ist nicht zum wenigsten den großen Schwierigkeiten zu verdanken, die sich einer quantitativen Trennung der koagulablen und nicht koagulablen stickstoffhaltigen Bestandteile des Blutes entgegenstellen. Eine nähere Besprechung der diesbezüglichen Untersuchungen gehört aber nicht hierher, und es würde auch zu weit führen, die bei der Ausscheidung der koagulablen Bestandteile des Blutes von den verschiedenen Forschern befolgte Methodik zu beschreiben. Es ist dies auch um so weniger notwendig, als H. Hohlweg und H. Meyer vor ein paar Jahren in der Einleitung zu ihrer schönen Arbeit: „Quantitative Untersuchungen über den Reststickstoff des Blutes"[1]) eine Übersicht über diese Fragen gegeben haben.

Die von Hohlweg und Meyer selbst benutzte Methode, deren Brauchbarkeit sie durch eine Reihe Kontrollbestimmungen bewiesen, war seinen Hauptzügen nach die folgende. Es wurde Serum mit einem Gemisch gleicher Teile 1%iger Essigsäure und 5%iger primärer Kaliumphosphatlösung so lange versetzt, bis die Reaktion Lackmus gegenüber sauer wurde, während sie gegen Kongo noch neutral blieb; dann wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung verdünnt und koaguliert. Gewöhnlich wurden 50 ccm Serum mit 50 ccm des Gemisches von Essigsäure und Kaliumphosphat versetzt und mit 300 ccm Wasser und 400 ccm gesättigter Kochsalzlösung verdünnt.

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 381, 1908.

Das Verfahren ist mit den gewöhnlichen Nachteilen der Koagulationsmethoden behaftet, die mit dem großen Salzgehalt der Lösung und mit der unsicheren Bestimmung der optimalen Menge des Säuerungsmittels in Zusammenhang stehen. Das Säuerungsmittel ist zwar von einer solchen Beschaffenheit gewählt worden, daß ein kleiner Überschuß kaum von wesentlicher Bedeutung sein kann; auf der anderen Seite aber ist die Bestimmung des „Wieviel" weit davon entfernt, scharf zu sein. Hohlweg und Meyer machen selbst ausdrücklich darauf aufmerksam (l. c. S. 387): „Der Spielraum vom Auftreten der sauren Reaktion gegen Lackmus bis zum Auftreten einer Kongoreaktion ist allerdings ein ziemlich großer, somit die Bezeichnung ‚gegen Lackmus sauer, gegen Kongo noch neutral' keine sehr scharfe."

Um diese Sachlage etwas näher zu beleuchten, werden wir die Einzelheiten einer von uns ausgeführten Versuchsreihe mit Pferdeblutserum anführen:

Zu 20 ccm Serum wurde unter Umrühren das von Hohlweg und Meyer empfohlene Gemisch von 1%iger Essigsäure und 5%iger Kaliumphosphatlösung getröpfelt.

Nach Zusatz von 3 ccm war die Reaktion gegen Lackmuspapier schwach sauer, von 4 ccm ausgesprochen sauer, von 6 ccm stark sauer und von 10 ccm sehr stark sauer; aber selbst nach Zugabe von 50 ccm der Essigsäure-Phosphatmischung war die Reaktion des Serums nicht sauer gegen Kongopapier. Das ist an und für sich ganz natürlich, wenn man sich erinnert, daß Kongo in Gegenwart genuiner Proteine ein ganz unbrauchbarer Indicator ist;[1]) es zeigt aber gleichzeitig die der Festlegung der optimalen Menge des Säuerungsmittels anhaftende Unsicherheit.

Wir machten sodann eine Reihe Koagulationsversuche genau mit den von Hohlweg und Meyer angewandten Verdünnungsverhältnissen. In Kolben von Jenaglas wurden gebracht 20 ccm Serum, a ccm der Essigsäure-Phosphatmischung, (140 — a) ccm Wasser und 160 ccm gesättigte Chlornatriumlösung. Dann wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert, wonach die Kolben in kaltes Wasser gestellt wurden; am folgenden Tage wurde filtriert und der Gesamtstickstoff in

---

[1]) Siehe diese Zeitschr. 21, 217, 1909.

200 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Hinsichtlich der in jedem einzelnen Versuche angewandten Menge des Essigsäure-Phosphatgemisches war die Tatsache für uns maßgebend, daß eine Zugabe von 10 ccm des Gemisches hinreichte, um dem Serum eine sehr stark saure Reaktion gegen Lackmus zu erteilen, und daß andernteils Hohlweg und Meyer gleiche Raumteile von Serum und Säuerungsgemisch als für gewöhnlich passend angeben. Da das Erhitzen aller Kolben zu gleicher Zeit und unter gleichen Umständen vor sich ging, so ist die Verdampfung des Wassers während der Koagulation für den Vergleich ohne Belang; eine Kontrollwägung hat übrigens gezeigt, daß in jedem Versuche etwa 4 g Wasser verdampft waren. Die Versuchsresultate gehen aus der Tabelle I hervor; beim Ausrechnen der Zahlen des letzten Stabes ist auf das verdampfte Wasser Rücksicht genommen, dagegen aber nicht, weder hier noch bei späteren Versuchen, auf das Volumen des Gerinnsels.

Aus der Tabelle I ist zunächst ersichtlich, daß 10 ccm (Versuch Nr. 1) des Essigsäure-Phosphatgemisches bei weitem nicht hinreichen, um die optimalen Koagulationsbedingungen zuwege zu bringen; trotzdem, wie oben erwähnt, eine solche Zugabe dem Serum eine sehr stark saure Reaktion Lackmuspapier gegenüber erteilt. Ja, selbst nicht das von Hohlweg und Meyer benutzte Verhältnis, gleiche Raumteile Serum und Säuerungsgemisch (Versuch Nr. 5), gibt die optimalen Bedingungen; diese werden erst mit der Anwendung von 23 ccm der Essigsäure-Phosphatmischung erreicht.

Tabelle I.
Koagulation von Serum nach Hohlweg und Meyer.
20 ccm Serum: 233,0 mg Gesamtstickstoff.

Versuchs-nummer	Angewandte Menge (a) der Essigsäure-Phosphat-mischung ccm	Gesamtstickstoff der nicht koagulierten Stoffe	
		in 200 ccm des Filtrats mg	in 20 ccm Serum mg
1	10	5,59	8,83
2	14	4,79	7,57
3	17	4,84	7,65
4	19	4,76	7,52
5	20	4,73	7,47
6	21	4,56	7,20
7	23	3,95	6,24
8	25	4,19	6,62

Die nächste Frage, die sich dann erhob, war diese: Ist es möglich, ohne Salzzusatz, nur mittels passender Säuerung, eine ebenso vollständige Ausscheidung der koagulablen, stickstoffhaltigen Bestandteile des Serums zu erreichen als nach dem Verfahren von Hohlweg und Meyer? Um diese Frage zu beantworten, wurden 3 Versuchsreihen angestellt mit derselben Art von Serum als die, die bei der Koagulation nach Hohlweg und Meyer benutzt wurde.

In 100-Kubikzentimeter-Meßkolben wurden abpipettiert je 20 ccm Serum, a ccm Säure (Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure) nebst (55 — a) ccm Wasser. Danach wurde genau 15 Minuten in siedendem Wasser erhitzt und die Kolben nachher in Wasser gekühlt; nach Stehenlassen bis zum nächsten Tag wurde mit Wasser bis zur Marke verdünnt und dann nach gutem und wiederholtem Schütteln und erneuertem Stehenlassen nach 3 bis 4 Stunden filtriert. Der Gesamtstickstoff wurde in 50 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Koagulation von Serum nach Zugabe von Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure.

20 ccm Serum: 233,0 mg Gesamtstickstoff.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) von Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Gesamtstickstoff der nicht koagulierten Verbindungen					
		in 50 ccm des Filtrats nach Säuerung mittels			in 20 ccm Serum nach Säuerung mittels		
		Salzsäure mg	Schwefelsäure mg	Essigsäure mg	Salzsäure mg	Schwefelsäure mg	Essigsäure mg
9	7	3,75	3,92	4,05	7,50	7,84	8,10
10	8	3,25	3,38	3,54	6,50	6,76	7,08
11	9	3,20	3,26	3,23	6,40	6,52	6,46
12	10	3,16	3,27	3,18	6,32	6,54	6,36
13	11	3,46	3,35	3,15	6,92	6,70	6,30
14	12	u. K.[1]	3,35	3,23	—	6,70	6,46
15	13	—	3,46	3,31	—	6,92	6,62
16	14	—	3,98	3,45	—	7,96	6,90

Aus der Tabelle ist zunächst zu ersehen, daß es möglich ist, durch einfache Säuerung und Koagulation bis auf praktisch genommen ebenso kleine Werte des Gehalts an nicht koagulablen Stickstoffkörpern herunter zu kommen, als mittels des

[1]) Unvollständige Koagulation.

Verfahrens nach Hohlweg und Meyer: ja, die Optimalzone scheint sogar, besonders bei Anwendung von Essigsäure, breiter zu sein als beim Versuche nach Hohlweg und Meyer. In jedem Falle müssen die optimalen Bedingungen experimentell ermittelt werden.

Die optimale Säuremenge ist in den hier besprochenen Versuchen ungefähr die gleiche bei jeder der 3 Säuren; wir machen auf dieses Verhältnis aufmerksam, weil wir sonst alles übrige gleich, immer die optimale Säuremenge der Essigsäure ein wenig größer als die der zwei anderen Säuren gefunden haben.

Endlich zeigt die Tabelle deutlich den Unterschied zwischen der Wirkungsweise einer starken und der einer schwachen Säure (bzw. Salzsäure und Essigsäure; die Schwefelsäure fügt sich natürlich dazwischen ein). Ein Defizit des Säuerungsmittels — die Versuche 9 und 10 — verursacht einen kleineren Fehler bei der Koagulation, wenn Salzsäure, als wenn Essigsäure verwendet wird. Bei einem Überschuß von Säure — Versuche 14, 15 und 16 — ist das Verhältnis gerade das umgekehrte; während auch nur ein ganz kleiner Überschuß von Salzsäure eine geradezu sichtbar unvollständige Koagulation verursacht, geben selbst einige Kubikzentimeter überschüssiger Essigsäure nur einen geringen Koagulationsfehler. Dieses leicht erklärliche, aber wichtige und interessante Verhältnis haben wir bei zahlreichen Versuchen immer wieder getroffen.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren haben wir stets die für die Koagulation optimale Säuremenge ermittelt. Im folgenden Abschnitt wird man zahlreiche Beispiele von Versuchsreihen dieser Art finden, und wir beschränken uns deshalb hier darauf, nur noch ein paar mit Eiereiweiß ausgeführte Reihen anzuführen, die den Einfluß beleuchten, den ein Zusatz von Kochsalz auf den Verlauf der Koagulation ausübt.

Für jeden Versuch wurden angewandt: 50 ccm etwa 4%ige Lösung rohen Eiereiweißes[1]), a ccm 0,1 n-Salzsäure, nebst, in der ersten Reihe, (20 — a) ccm Wasser und, in der zweiten Reihe, 5 ccm 2 n-Natriumchloridlösung + (15 — a) ccm Wasser. Das Volumen war somit während der Koagulation

[1]) Nach dem üblichen Verfahren hergestellt (siehe diese Zeitschr. 7, 90, 1907).

70 ccm in beiden Reihen. Es wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert und übrigens ganz wie oben beschrieben gearbeitet. Die Resultate finden sich in der Tabelle III.

Tabelle III.

Koagulation einer Lösung von Eiereiweiß nach dem Ansäuern mit Salzsäure ohne oder mit Zugabe von Natriumchlorid.

50 ccm Eiweißlösung: 261 mg Gesamtstickstoff.

Erste Reihe (ohne Salzzugabe)			Zweite Reihe (mit Salzzugabe)		
Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure in 0,1 n-Lösung ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
17	9,0	14,58	24	9,0	16,80
18	9,5	13,54	25	9,5	16,50
19	10,0	12,21	26	10,0	16,38
20	10,5	11,95	27	10,5	16,20
21	11,0	12,51	28	11,0	16,10
22	11,5	13,76	29	11,5	16,13
23	12,0	14,69	30	12,0	16,08
—	—	—	31	12,5	16,28
—	—	—	32	13,0	16,33

Aus der Tabelle III geht hervor:

1. daß der Optimalpunkt, der in der ersten Reihe bei einem Säurezusatz von 10,5 ccm gefunden wird (Versuch Nr. 20), durch die Zugabe von Salz gegen die saure Seite hin verschoben wird, indem die optimale Säuremenge in der zweiten Reihe gleich 11,5 ccm gesetzt werden muß (Versuch Nr. 29). Elektrometrische Messungen haben für das Gemisch im Versuch Nr. 20 eine Wasserstoffionenkonzentration, dem $p_{H^{\cdot}} = 4{,}65$ entsprechend, ergeben, während die Messung für den Versuch Nr. 29 $p_{H^{\cdot}} = 4{,}52$ ergab;

2. daß die Lage des Optimalpunktes in der ersten Reihe weit schärfer ausgesprochen ist als in der zweiten; in dieser letzteren liegt eher eine Optimalzone vor. Die Salzzugabe bewirkt somit, daß Abweichungen von der optimalen Säuremenge von geringerem Belang werden; man ersieht aber zugleich,

3. daß das Filtrat der zweiten Versuchsreihe weit mehr Stickstoff enthält als das der ersten. Der Zusatz von Salz hat somit eine weniger vollständige oder jedenfalls eine langsamere Koagulation bewirkt (vgl. Abschnitt C).

B. Die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration bei der Koagulation.

a) Schon in der Einleitung sind sowohl die bei diesen Versuchen befolgte Methode als auch die dadurch erhaltenen Resultate in Kürze auseinandergesetzt worden. Zur näheren Beleuchtung der Einzelheiten des Verfahrens soll hier ein einzelner Versuch ausführlich beschrieben werden.

350 ccm einer ca. 4 °/₀igen Lösung rohen Hühnereiweißes wurden mit 10 ccm n-Salzsäure versetzt und dann von einem Tag bis zum anderen Wasserstoff durchgeleitet, um die Kohlensäure auszutreiben. Die Zugabe von Säure war so gewählt, daß die Konzentration der Wasserstoffionen, die durch elektrometrische Messung dem $p_{H^{\cdot}} = 3{,}89$ entsprechend ermittelt wurde, einerseits dazu ausreichte, daß alle Kohlensäure wirklich ausgetrieben werden konnte, andererseits aber doch nicht so groß wurde, daß eine wesentliche Acidalbuminbildung durch Stehenlassen bei Zimmertemperatur zu befürchten wäre.

Für die so hergestellte Lösung wurden die optimalen Versuchsbedingungen in der im vorigen Abschnitt erwähnten Weise ermittelt. In 100-ccm-Meßkolben wurden abpipettiert je 50 ccm der sauren Eiweißlösung (13,9 ccm 0,1 n-Salzsäure enthaltend), a ccm 0,1 n-Natriumhydroxydlösung und (6 — a) ccm Wasser, indem das Flüssigkeitsvolumen bei diesem und den folgenden Versuchen 56 ccm betrug. Danach wurde in siedendem Wasser 15 Minuten koaguliert und in Wasser abgekühlt. Am nächsten Tage wurde mit Wasser bis auf die Marke verdünnt, nach reichlichem und wiederholtem Schütteln und nochmaligem Stehenlassen nach 3 bis 4 Stunden filtriert und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Kjeldahl bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Es erhellt aus der Tabelle IV, daß man die optimalen Koagulationsbedingungen in Versuch 2 gehabt hat. Zufolge dessen wurde der Hauptversuch folgenderweise angestellt: 700 ccm der oben genannten, ca. 4 °/₀igen Eiweißlösung wurden mit 20 ccm n-Salzsäure versetzt und über Nacht ein Wasserstoffstrom durch die Mischung geleitet. Die Hauptlösung wurde dargestellt aus

500 ccm der sauren, mit Wasserstoff behandelten Eiweißlösung,
41 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung,
19 „ Wasser,

zusammen 560 ccm.

300 ccm dieser Flüssigkeit wurden durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen in einem mit Rückflußkühler versehenen Jenakolben in siedendem Wasser koaguliert. Der Kolben wurde vor und nach der Koagulation gewogen, der Verlust betrug nur 0,15 g; nach der Abkühlung wurden deshalb 3 Tropfen Wasser zugegeben. Nach Abkühlung, wiederholtem Schütteln und Stehenlassen bis zum nächsten Tage wurde filtriert.

Tabelle IV.
Koagulation von Eiereiweißlösung nach Zugabe von Salzsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Natriumhydroxydlösung ccm	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte 0,1 n-Salzsäure (13,9 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
1	4,6	9,3	13,45
2	4,1	9,8	11,53
3	3,6	10,3	12,15
4	3,1	10,8	14,12
5	2,6	11,3	unvollständige Koagulation

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde in der früher beschriebenen Weise[1]) elektrometrisch gemessen, und zwar sowohl in der Hauptportion vor der Koagulation, als auch im Filtrat nach derselben; der Gesamtstickstoff derselben 2 Lösungen wurde ebenfalls nach Kjeldahl bestimmt.

Die Wasserstoffionenkonzentration vor der Koagulation entsprach dem $p_{H^\cdot} = 4{,}60$, die des Filtrats dagegen $p_{H^\cdot} = 5{,}21$.

50 ccm der Hauptlösung enthielten 249 mg N,
50 „ des Filtrats „ 19,75 „ N,

was 7,93% der ganzen Stickstoffmenge entspricht.

Wir möchten die Aufmerksamkeit darauf lenken, daß im Versuch Nr. 2, Tabelle IV, 50 ccm des Filtrats, 28 ccm der Hauptlösung entsprechend, 11,53 mg Stickstoff enthielten. Dem-

[1]) Diese Zeitschr. 21, 150, 1909.

entsprechend sollten im Hauptversuche, wo keine Verdünnung stattfand, 50 ccm des Filtrats $11,53 \times \frac{50}{28} = 20,59$ mg Stickstoff enthalten; es sind indessen nur 19,75 mg gefunden worden. Das rührt, wie direkte Kontrollversuche uns gelehrt haben, nicht davon her, daß das bei den Vorversuchen zugesetzte Wasser etwas vom Gerinnsel wieder auflöst, sondern hat seine Ursache in der verschiedenen Koagulationsdauer. In allen Vorversuchen haben wir nur 15 Minuten erwärmt, in den Hauptversuchen dagegen haben wir, der größeren Flüssigkeitsmenge wegen, $^1/_2$ Stunde erhitzt. Das spielt, wie schon in der Einleitung (S. 401) erwähnt worden ist und wie in einem folgenden Abschnitt näher erörtert werden soll, bei der Koagulation von Eiereiweiß eine Rolle, dagegen aber nicht bei derjenigen des Serums. Für sämtliche im folgenden angeführten Versuche wird eine einfache Rechnung die Richtigkeit des hier Angeführten bestätigen.

Ganz wie hier beschrieben, aber mit anderen Eiweißlösungen wurden entsprechende Versuche mit Schwefelsäure bzw. Milchsäure oder Essigsäure als Säuerungsmittel ausgeführt. Die Resultate der Vorversuche sind in der Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

Koagulation von Eiereiweißlösung nach der Zugabe von Schwefelsäure, bzw. Milchsäure oder Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Schwefelsäure (13,9 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Milchsäure (13,5 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Zugefügte, durch Natriumhydroxyd nicht neutralisierte Menge von 0,1 n-Essigsäure (20,6 — a) ccm	Stickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
6	7,8	15,24	11	8,0	12,18	18	16,6	10,77
7	8,8	14,14	12	9,0	11,08	19	17,6	10,21
8	9,3	13,87	13	9,5	10,13	20	18,6	10,25
9	9,8	13,38	14	10,0	10,03	21	19,6	10,20
10	10,8	14,05	15	10,5	10,25	22	20,6	10,56
—	—	—	16	11,0	10,95	—	—	—
—	—	—	17	12,0	11,75	—	—	—

Auf Grund dieser vorläufigen Versuche wurden dann die Hauptversuche mit folgenden Lösungen und mit folgenden Ergebnissen ausgeführt:

Ansäuern mittels Schwefelsäure.

700 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 20 ccm n-Schwefelsäure versetzt und dann Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
43,5 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Der Optimalpunkt ist inmitten der Versuche Nr. 8 und 9 angenommen
16,5 „ Wasser

560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,68$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 5,51$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 244 mg N
50 „ des Filtrats „ 23,9 „ „
(= 9,80% des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Milchsäure.

630 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 90 ccm 0,2 n-Milchsäure versetzt und Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
25 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 14 liegend angenommen
35 „ Wasser

560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,69$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 4,92$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 210 mg N
50 „ des Filtrats „ 15,3 „ „
(= 7,29% des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

500 ccm einer ca. 4%igen Eiweißlösung wurden mit 130 ccm 0,2 n-Essigsäure versetzt und Wasserstoff durchgeleitet.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm der sauren Eiweißlösung
20 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 20 liegend angenommen
40 „ Wasser

560 ccm insgesamt.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,69$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 4,76$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 199 mg N
50 „ des Filtrats „ 15,9 „ „
(= 7,99% des Gesamtstickstoffs).

Ganz ähnliche Resultate bekamen wir, selbst wenn die vorläufigen Versuche ohne vorhergehende Durchleitung von Wasserstoff durch die saure Flüssigkeit ausgeführt wurden und die Hauptportion während der Wasserstoffdurchleitung nur die bei den Vorversuchen ermittelte optimale Säuremenge enthielt. Ein Beispiel, in dem Salzsäure als Säuerungsmittel diente, sei angeführt.

Die vorläufigen Versuche wurden mit 50 ccm ca. 4%iger, nicht „hydrogenisierter" Eiweißlösung, a ccm 0,1 n-Salzsäure und (20 — a) ccm Wasser ausgeführt. Das Volumen während der Koagulation war somit 70 ccm; es wurde, wie üblich, auf 100 ccm aufgefüllt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt. Das Resultat der Versuche findet man in der Tabelle VI.

Tabelle VI.

Koagulation von Eiereiweißlösung nach Zugabe von Salzsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Angewandte Menge Wasser ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
23	9,5	10,5	12,45
24	10,0	10,0	11,58
25	10,5	9,5	11,69
26	11,0	9,0	12,93
27	11,5	8,5	13,85
28	12,0	8,0	14,55

Der Hauptversuch wurde danach mit der folgenden Lösung ausgeführt:

500 ccm ca. 4%ige Eiweißlösung
100 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 24 angenommen
100 „ Wasser

Durch die Mischung wurde ein Wasserstoffstrom von einem Tage bis zum andern geleitet und dann filtriert.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,69$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 5,36$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 189 mg N
50 „ des Filtrats „ 14,1 „ „
(= 7,46% des Gesamtstickstoffs).

b) Versuche mit Eiweißlösungen, die mittels Dialyse von Salzen befreit waren. Eine ca. 4%ige Eiweißlösung wurde mit Salzsäure bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure schwach angesäuert und danach im Laufe etwa eines Monats

gegen reines, häufig erneuertes Wasser sorgfältig dialysiert. Als Membran diente Pergamentpapier, und um Fäulnis zu verhindern, wurde die Dialyse im Eisschrank vorgenommen und die Eiweißlösung während der Dialyse mit Toluol gesättigt und überschichtet. Nach Abschluß der Dialyse war in der mit Schwefelsäure angesäuerten Portion keine Schwefelsäure mehr nachweisbar, und in der mit Salzsäure versetzten Portion ließ sich nur eine ganz schwache Spur von Salzsäure erkennen. Nach wiederholtem Filtrieren verjagte man mittels eines Wasserstoffstroms den letzten Rest von Toluol aus den Eiweißlösungen, wonach diese zu ähnlichen Versuchen wie die oben beschriebenen benutzt wurden.

Die vorläufigen Versuche wurden mit 50 ccm Eiweißlösung, a ccm 0,1 n-Säure (bzw. Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure) nebst (15 — a) ccm Wasser angestellt. Das Volumen während der Koagulation war somit 65 ccm; wie üblich wurde bei den vorläufigen Versuchen 15 Minuten, bei den Hauptversuchen aber $^1/_2$ Stunde erhitzt. Gleichfalls, wie üblich, wurde nach dem Koagulieren auf 100 ccm verdünnt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt.

Die Resultate der vorläufigen Versuche sind in der Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Koagulation einer mit Salzsäure, bzw. Schwefelsäure oder Essigsäure versetzten, salzarmen Eiereiweißlösung.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Bemerkung	Versuchs-Nr.	Angew. Menge 0,1 n-Schwefelsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,1 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
29	2,0	—	Wegen Säurespaltung sehr unvollständige Koagulation	37	3,5	filtrierte sehr langsam	44	5,0	7,67
30	1,7	7,35	filtrierte gut	38	3,0	9,35	45	4,5	7,25
31	1,4	6,95	filtrierte besonders gut und schnell	39	2,5	8,77	46	4,0	7,25
32	1,1	8,66	filtrierte ziemlich gut	40	2,0	8,70	47	3,5	7,33
33	0,8	9,15	filtrierte langsam	41	1,5	9,87	48	3,0	7,77
34	0,5	—	filtrierte sehr langsam	42	1,0	10,65	49	2,5	8,55
35	0,2	—	ließ sich beinahe nicht filtrieren	43	0,5	koagulierte nicht	50	2,0	9,50
36	0,0	—	do.	—	—	—	51	1,0	10,97

Mit diesen Vorversuchen als Grundlage wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Ansäuern mittels Salzsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
14 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 31 liegend angenommen
136 „ Wasser
650 ccm insgesamt.

Durch die Lösung wurde über Nacht ein Wasserstoffstrom geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4{,}82$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 5{,}45$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 126 mg N
50 „ des Filtrats „ 9,27 „ „
(= 7,36 % des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Schwefelsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
22,5 „ 0,1 n-Schwefelsäure } Optimalpunkt in der Mitte zwischen den Versuchen Nr. 39 und 40 angenommen
127,5 „ Wasser
650 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4{,}71$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 5{,}25$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 142 mg N
50 „ des Filtrats „ 11,45 „ „
(= 8,06 % des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

500 ccm salzarmer Eiweißlösung
40 „ 0,1 n-Essigsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 46 angenommen
110 „ Wasser
650 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4{,}73$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 4{,}78$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 135 mg N
50 „ des Filtrats „ 9,46 „ „
(= 7,01% des Gesamtstickstoffs)

Die mitgeteilten Stickstoffbestimmungen der Hauptlösungen zeigen, daß hier etwas schwächere Eiweißlösungen vorliegen als diejenigen, mit denen die früher erwähnten Versuche gemacht wurden; selbst mit gebührender Rücksicht darauf ist es aber aus der Tabelle VII deutlich zu ersehen, wie klein die Säuremengen sind, die hinreichen, um salzarmen Eiweißlösungen die optimalen Koagulationsverhältnisse zu verleihen. Ebenfalls sieht man — natürlich besonders deutlich bei den Versuchen mit Salzsäure — wieviel kleine Änderungen in den zugefügten Säuremengen für den Verlauf der Koagulation bedeuten.

c) Versuche mit Eiweißlösungen verschiedener Konzentration. Es wurden 3 Versuchsreihen ausgeführt. Bei allen Vorversuchen war das Volumen während der Koagulation 70 ccm, die Mischung war aber in der ersten Reihe hergestellt aus:

50 ccm 4%iger Eiweißlösung,
a „ 0,1 n-Salzsäure,
(20 — a) „ Wasser,

in der zweiten Reihe aus:

25 ccm 4%iger Eiweißlösung,
a „ 0,02 n-Salzsäure,
(45 — a) „ Wasser,

in der dritten Reihe aus:

10 ccm 4%iger Eiweißlösung,
a „ 0,02 n-Salzsäure,
(60 — a) „ Wasser.

Übrigens war das Verfahren das gewöhnliche; die Koagulationsdauer war 15 Minuten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII.
Koagulation von Eiereiweiß in verschiedener Konzentration; Ansäuern mittels Salzsäure.

50 ccm Eiweißlösung			25 ccm Eiweißlösung			10 ccm Eiweißlösung		
Versuchs-Nr.	Angew. Menge (a) Salzsäure 0,1 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure 0,02 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) Salzsäure 0,02 n-Säure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
52	9,0	14,58	59	20,00	7,92	65	8,0	3,26
53	9,5	13,54	60	22,50	7,34	66	8,5	3,15
54	10,0	12,21	61	23,75	6,72	67	9,0	2,98
55	10,5	11,95	62	25,00	6,59	68	9,5	2,85
56	11,0	12,51	63	26,25	6,93	69	10,0	2,96
57	11,5	13,76	64	27,50	7,29	70	10,5	3,33
58	12,0	14,69	—	—	—	—	—	—

Auf diesen Vorversuchen fußend wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Die Hauptlösung des ersten Versuchs bestand aus:

250 ccm ca. $4\,^0/_0$iger Eiweißlösung
52,5 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 55 angenommen
47,5 „ Wasser
350 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde Wasserstoff durch die Lösung geleitet. Koagulationsdauer: $^1/_2$ Stunde.

Vor der Koagulation $p_{H^\cdot} = 4{,}65$
Nach „ „ $p_{H^\cdot} = 5{,}32$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 186 mg N
50 „ des Filtrats „ 14,38 „ „
($= 7{,}73\,^0/_0$ des Gesamtstickstoffs).

Die Hauptlösung des zweiten Versuchs bestand aus:

100 ccm ca. $4\,^0/_0$iger Eiweißlösung
20 „ 0,1 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 62 angenommen
160 „ Wasser
280 ccm insgesamt.

Behandlung mit Wasserstoff und Koagulation wie oben.

Vor der Koagulation $p_{H^\cdot} = 4{,}72$
Nach „ „ $p_{H^\cdot} = 5{,}41$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 93,2 mg N
50 „ des Filtrats „ 7,98 „ „
(= 8,56% des Gesamtstickstoffs).

Die Hauptlösung des dritten Versuchs bestand aus:

50 ccm ca. 4%iger Eiweißlösung
47,5 „ 0,02 n-Salzsäure } Optimalpunkt beim Versuch Nr. 68 angenommen
252,5 „ Wasser
350 ccm insgesamt.

Wasserstoffbehandlung und Koagulation wie oben.

Vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,94$
Nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 6,31$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 37,3 mg N
50 „ des Filtrats „ 3,98 „ „
(= 10,67% des Gesamtstickstoffs).

Aus der Tabelle VIII sowie auch aus den Ergebnissen der Hauptversuche erhellt:

1. Daß die optimale Säuremenge der angewandten Menge Eiweißlösung nicht völlig proportional ist, sondern ein klein wenig stärker als die Proteinkonzentration wächst.

2. Damit übereinstimmend ist die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration größer, $p_{H^{\cdot}}$ somit kleiner, bei starken als bei schwachen Eiweißlösungen (siehe S. 433).

3. Die Menge der nicht koagulierten Stickstoffverbindungen wächst nicht ganz proportional mit der Konzentration der Eiweißlösung, sondern wird bei den schwachen Lösungen verhältnismäßig am größten gefunden.

d) Versuche mit Pferdeblutserum. Schließlich mögen noch ein paar Versuchsreihen angeführt werden, in denen Pferdeblutserum zur Anwendung gekommen ist. In der einen Reihe wurde ein durch Hämoglobin etwas gefärbtes Serum und Salzsäure als Säuerungsmittel angewandt; in der anderen wurde ein rein gelbes Serum benutzt und mit Essigsäure angesäuert. Bei den vorläufigen Versuchen wurde in beiden Reihen 40 ccm Serum, a ccm 0,2 n-Salzsäure oder Essigsäure nebst (30 — a) ccm Wasser gebraucht. Das Volumen während der Koagulation war somit 70 ccm. Das Verfahren sonst wie üblich. Das Ergebnis der Vorversuche findet sich in der Tabelle IX (siehe S. 418) zusammengestellt.

Tabelle IX.

Koagulation von Pferdeblutserum nach Zugabe von Salzsäure bzw. Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,2 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Angewandte Menge 0,2 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats mg
71	6	12,97	78	12	6,10
72	7	10,80	79	14	5,90
73	8	8,78	80	16	5,92
74	9	8,05	81	18	5,91
75	10	7,77	82	20	5,97
76	11	7,83	83	22	6,10
77	12	8,07	84	24	6,24

Auf Grund dieser Vorversuche wurden dann die Hauptversuche ausgeführt.

Ansäuern mittels Salzsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

200 ccm Serum
52,5 „ 0,2 n-Salzsäure } Die Mitte zwischen den Versuchen Nr. 75 und 76 als
97,5 „ Wasser } Optimalpunkt angenommen
350 ccm insgesamt.

Durch die Lösung wurde über Nacht Wasserstoff geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^\cdot} = 4,66$
Nach „ „ $p_{H^\cdot} = 5,25$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 326 mg N
50 „ des Filtrats „ 10,8 „ „
(= 3,31 $^0/_0$ des Gesamtstickstoffs).

Ansäuern mittels Essigsäure.

Die Hauptlösung bestand aus:

250 ccm Serum
106 „ 0,2 n-Essigsäure } Die Mitte zwischen den Versuchen Nr. 80 und 81 als
81 „ Wasser } Optimalpunkt angenommen
437 ccm insgesamt.

Über Nacht wurde ein Wasserstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Vor der Koagulation $p_{H^\cdot} = 4,68$
Nach „ „ $p_{H^\cdot} = 4,80$

50 ccm der Hauptlösung enthielten 284 mg N
50 „ des Filtrats „ 8,6 „ „
(= 3,03 $^0/_0$ des Gesamtstickstoffs).

e) In der Tabelle X sind die Ergebnisse sämtlicher in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche eingetragen worden.

Man ersieht aus den im dritten Stab der Tabelle aufgeführten Werten von $p_{H^{\cdot}}$, **daß die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration einigermaßen konstant ist und wesentlich größer als diejenige Wasserstoffionenkonzentration, die nach den Untersuchungen von L. Michaelis, P. Rona und P. Mostynski (S. 398) dem isoelektrischen Punkt des Serumalbumins entspricht.** Dieselbe wird nämlich in der letzten Arbeit von L. **Michaelis** und P. Rona[1]) gleich $0{,}3 \times 10^{-5}$, $p_{H^{\cdot}} = 5{,}52$ entsprechend, angegeben (siehe übrigens S. 432).

Wie schon in der Einleitung (siehe S. 398) erwähnt, variiert der Wert des $p_{H^{\cdot}}$ ein wenig mit der Konzentration der Proteinlösung, indem $p_{H^{\cdot}}$ desto größer ist, je schwächer die betreffende Proteinlösung ist; besonders aufklärend in dieser Beziehung sind die drei Versuche, die mit derselben Eiweißlösung, aber in verschiedener Verdünnung, ausgeführt sind. Außerdem ist der optimale Wert des $p_{H^{\cdot}}$ für die dialysierten, salzarmen Lösungen durchgehends etwas größer gefunden als für die nicht dialysierten, salzreichen; doch ist der Unterschied nicht größer, als daß er sich durch den kleinen Proteingehalt der dialysierten Lösungen erklären läßt. Zieht man indessen auch noch die im Schluß des vorigen Abschnitts (siehe S. 407) erwähnten Versuche mit in Betracht, so kann es wohl keinem Zweifel unterliegen, daß ein Zusatz von Salz die für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration ein wenig gegen die saure Seite hin verschiebt, so daß $p_{H^{\cdot}}$ für salzreiche Lösungen niedriger als für salzarme gefunden wird.

Die hier erwähnten Abweichungen der gefundenen Optimalwerte des $p_{H^{\cdot}}$ untereinander sind zwar nur klein, rühren aber doch sicherlich nicht von Versuchsfehlern her. Man muß sich immerhin erinnern, daß die Messung der Wasserstoffionenkonzentration bei 18° vorgenommen, während die Koagulation bei 100° ausgeführt wurde. Da die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration durch Erhöhung der Temperatur von 18° auf 100° höchstwahrscheinlich sowohl von der Konzentration der Proteinlösung als auch vom Salzgehalt der Lösung abhängig ist, so haben wir hier eine Fehlerquelle, über deren Bedeutung die von uns gemachten Versuche keine Auskunft geben. Wir sind aber doch der

---

[1]) Diese Zeitschr. 27, 38, 1910.

Tabelle

Übersicht über die Änderung der Wasserstoff-

Die angewandte Proteinlösung	Die angewandte Säure	Die Wasserstoffionen-konzentration vor der Koagulation p_H.	nach der Koagulation p_H.
Eiereiweißlösung (nicht dialysiert)	Salzsäure	4,60	5,21
„ („ „)	„	4,69	5,36
„ („ „)	„	4,65	5,32
„ („ „)	„	4,72	5,41
„ („ „)	„	4,94	6,31
„ (dialysiert)	„	4,82	5,45
„ (nicht dialysiert)	Schwefelsäure	4,68	5,51
„ (dialysiert)	„	4,71	5,25
„ (nicht dialysiert)	Milchsäure	4,69	4,92
„ („ „)	Essigsäure	4,69	4,76
„ (dialysiert)	„	4,73	4,78
Pferdeblutserum (rötlich, nicht dialysiert) . .	Salzsäure	4,66	5,25
„ (gelb, „ „) . .	Essigsäure	4,68	4,80

Ansicht, daß die genannten Variationen im Optimalwerte des p_H. nicht einer Fehlerquelle der Methode zuzuschreiben sind, sondern, wie es im folgenden des näheren erwähnt werden wird, vielmehr im wesentlichen auf die Konzentration der Proteinlösung zurückzuführen sind (siehe S. 428).

Was den Gesamtstickstoff im Filtrat nach der Koagulation anlangt, so hängt die absolute Menge natürlich vom Gesamtstickstoff vor der Koagulation ab, das Verhältnis zwischen den beiden ist aber in allen Versuchen mit Eiereiweiß (Koagulationsdauer: $^1/_2$ Stunde) einigermassen dasselbe, indem nämlich ersterer 7 bis 8$^0/_0$ vom letzteren beträgt (Tabelle X, vorletzter Stab). Nur in denjenigen Versuchen, in denen mit Schwefelsäure angesäuert wurde oder die Proteinkonzentration ganz klein ist, ist die prozentische Menge nicht auskoagulierter Stickstoffverbindungen ein wenig größer gefunden worden. Die dialysierten Lösungen haben immer einen kleineren Stickstoffgehalt im Filtrate gegeben als die nicht dialysierten; das rührt zweifellos nur zum Teil davon her, daß nicht koagulable Stickstoffkörper wegdialysiert sind, eher aber davon (man vergleiche die Versuche S. 407), daß die Koagulation in salzreichen Lösungen weniger vollständig oder jedenfalls weniger schnell verläuft als in salzarmen.

X.

ionenkonzentration während der Koagulation.

Milligramm Stickstoff in 50 ccm der Lösung vor der Koagulat. a	Milligramm Stickstoff in 50 ccm des Filtrats nach der Koagulat. b	b in % von a ausgedrückt	Bemerkung
249,0	19,75	7,93	Wasserstoffdurchleitung nach Zugabe überschüssiger Säure
189,0	14,10	7,46	" " " d. optimal. Säuremenge
186,0	14,38	7,73	do. (diese 3 Lösungen wurden aus derselben Eiweißlösung hergestellt)
93,2	7,98	8,56	
37,3	3,98	10,67	
126,0	9,27	7,36	Wasserstoffdurchleitung nach Zugabe d. optimal. Säuremenge
244,0	23,90	9,80	" " " überschüssiger Säure
142,0	11,45	8,06	" " " d. optimal. Säuremenge
210,0	15,30	7,29	" " " überschüssiger Säure
199,0	15,90	7,99	" " " " "
135,0	9,46	7,01	" " " d. optimal. Säuremenge
326,0	10,80	3,31	" " " " " "
284,0	8,60	3,03	" " " " " "

Im Serum ist die Menge der nicht koagulablen oder nicht koagulierten Stickstoffverbindungen geringer als im Eiereiweiß.

Was endlich die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation betrifft, so zeigt ein Vergleich des p_H im dritten und vierten Stab der Tabelle, daß dieselbe in denjenigen Versuchen, in denen mittels der starken Säuren, Salzsäure oder Schwefelsäure, angesäuert wurde, weit größer ist als in den Versuchen mit Milchsäure oder Essigsäure.

Wir haben eine Erklärung dieses sonderbaren Verhaltens durch die Annahme versucht, daß bei der Koagulation nicht reines Protein, sondern ein Salz des Proteins mit der angewandten Säure ausgeschieden wird. Wenn diese Annahme richtig wäre, dann wäre natürlich zu erwarten, daß der Umfang dieser Salzbildung desto größer sein würde, je stärker die jeweilige Säure ist. Aus dem unten beschriebenen Versuch, in dem mit Salzsäure angesäuert wurde, ersieht man indessen, daß wir die Richtigkeit dieser Annahme nicht experimentell haben beweisen können; im Gegenteil, der Versuch zeigt, daß einer dialysierten,

salzarmen, mit der optimalen Menge Salzsäure angesäuerten Lösung von Eiereiweiß meßbare Mengen von Salzsäure durch die Koagulation nicht entzogen werden. Durch die Koagulation wird demnach — in guter Übereinstimmung mit den von Michaelis, Rona und Mostynski entwickelten Anschauungen — nur das Protein selbst ausgeschieden.

Für den Versuch wurde eine durch langdauernde Dialyse gereinigte Eiereiweißlösung angewandt, die in 50 ccm 372 mg Stickstoff enthielt. Die für die Koagulation optimale Salzsäuremenge wurde wie gewöhnlich ermittelt, und danach wurde der Hauptlösung die folgende Zusammensetzung gegeben:

300 ccm dialysierter Eiweißlösung,
30,5 „ 0,1 n-Salzsäure,
89,5 „ Wasser,
420 ccm insgesamt.

Die Lösung wurde in einem mit Rückflußkühler versehenen Kolben von Jenaglas durch Erhitzen in siedendem Wasser koaguliert. Es wurde 1 Stunde erwärmt, um eine große Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten, und damit übereinstimmend wurde gefunden:

vor der Koagulation $p_{H^{\cdot}} = 4,79$,
nach „ „ $p_{H^{\cdot}} = 6,02$.

100 ccm des nach Stehenlassen und Filtrierung erhaltenen Filtrats wurden mit 5 ccm 0,4 n-Barytlösung versetzt und die alkalische Flüssigkeit in einer Platinschale zur Trockne eingedampft. Der organische Verdampfungsrückstand wurde bei einer möglichst niedrigen Temperatur geglüht und der Glührückstand mit Wasser ausgelaugt. Die Chlormenge der erhaltenen Lösung wurde nach Volhard titrimetrisch ermittelt. Wir fanden in dieser Weise in 100 ccm Filtrat eine Chlormenge, die

a) 7,19 ccm 0,1 n-Salzsäure,
b) 7,20 „ 0,1 „

entsprach, während die berechnete Menge

$$\frac{30,5 \times 100}{420} = 7,26 \text{ ccm } 0,1 \text{ n-Salzsäure}$$

ist (ohne Rücksicht auf das Volum des Gerinnsels).

Ein Kontrollversuch wurde gemacht, indem eine Mischung von

30,5 ccm 0,1 n-Salzsäure und
389,5 „ Wasser
420 ccm insgesamt

in einem Jenakolben während 1 Stunde, wie oben erwähnt, erhitzt wurde, wonach 100 ccm der Mischung mit 5 ccm 0,4 n-Bariumhydroxydlösung eingedampft und der Rückstand über derselben Gasflamme und ebenso

lange Zeit wie im Hauptversuch geglüht wurde. Im Glührückstand fanden wir eine Chlormenge, die

a) 7,20 ccm 0,1 n-Salzsäure,
b) 7,22 „ 0,1 „

entsprach, somit dieselbe Menge wie in 100 ccm des Filtrats.

Wir müssen darauf aufmerksam machen, daß es nicht möglich ist, den Chlorgehalt des Filtrats genau nach Volhard ohne vorhergehendes Wegglühen des organischen Stoffes zu ermitteln, indem ein Teil des Silberchlorids, selbst auch bei Fällung in ziemlich stark salpetersaurer Flüssigkeit, in kolloidalem Zustand in Lösung bleibt. Aus demselben Grund darf man sich nicht darauf verlassen, daß eine Proteinlösung absolut chlorfrei ist, auch wenn sie, mit Salpetersäure angesäuert, mit Silbernitrat keine Trübung gibt. Endlich muß man sich vergegenwärtigen, daß das Wegglühen der stickstoffhaltigen Kohle in Gegenwart von Bariumhydroxyd möglicherweise zur Bildung von Cyaniden Anlaß geben kann.

Es wurden deshalb 50 ccm der ursprünglichen, zur Herstellung der Hauptlösung benutzten Eiweißlösung, die sich bei der gewöhnlichen Probe mittels Salpetersäure und Silbernitrat als völlig chlorfrei erwiesen hatten, mit 5 ccm 0,4 n-Bariumhydroxydlösung eingedampft, und der Rückstand wurde auf dieselbe Weise, in derselben Schale und über derselben Gasflamme geglüht, die beim Hauptversuche benutzt worden waren und weiter behandelt. Der wässerige Auszug des Glührückstands gab mit Salpetersäure und Silbernitrat eine schwache, aber deutliche Trübung. Ob diese von Cyanid oder von Chlorid herrührte, konnte nicht ermittelt werden; die Menge war aber jedenfalls so geringfügig, daß eine so geringe Cyanidbildung oder ein so niedriger Chlorgehalt keinen Einfluß auf die Beweiskraft der oben erwähnten Versuche ausüben kann.

In der schon in der Einleitung erwähnten Abhandlung[1]) betonen Michaelis und Rona zu wiederholten Malen stark, daß eine Abgabe von Kohlensäure während der Koagulation eine Reaktionsänderung in alkalischer Richtung bewirken werde. Auch wir haben selbstverständlich diesen Umstand mit in Betracht gezogen, weshalb wir mit Lösungen gearbeitet haben, die nach langdauernder Wasserstoffdurchleitung durch die saure Flüssigkeit als kohlensäurefrei angesehen werden mußten. Jedenfalls sind wir der Ansicht, daß die von uns wahrgenommene Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation sich nicht in dieser Weise erklären läßt. Wenn das der Fall wäre, stände es nämlich zu erwarten, daß die ausgetriebene Kohlensäure zwar von der Größe der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist, nicht aber von der Natur der zum Ansäuern angewandten Säure.

[1]) Diese Zeitschr. 18, 336, 1909.

Auch müssen wir es als völlig ausgeschlossen betrachten, daß die benutzten, dialysierten Eiweißlösungen solche Mengen von Kohlensäure oder Carbonaten hätten enthalten können, daß dieselbe in dieser Beziehung irgend eine Rolle zu spielen imstande wäre. Sollte von einer Entweichung von Kohlensäure die Rede sein können, dann müßte diese deshalb gewiß von einer Spaltung des Proteinmoleküls während der Koagulation herrühren, indem man sich wohl vorstellen könnte, daß die Kohlensäure in ähnlicher Weise wie in den von M. Siegfried untersuchten Carbaminoverbindungen[1]) im Proteinmolekül gebunden ist; auch diese Auffassung wird aber durch einige zur Erläuterung der Frage angestellten Versuche nicht gestützt. Es hat sich nämlich bei diesen unten beschriebenen, von Herrn S. Palitzsch ausgeführten Versuchen ergeben, daß überhaupt keine meßbaren Mengen von Kohlensäure durch die Koagulation entwickelt werden. Die Versuche wurden solcherweise angestellt, daß die beim Koagulieren eventuell entwickelte Kohlensäure in einer Bariumhydroxydlösung aufgefangen werden konnte.

Der erste Versuch wurde angestellt mit einer Mischung von 700 ccm in üblicher Weise dargestellter, etwa 4%iger genuiner Eiweißlösung, die nicht durch Dialyse von Salzen befreit worden war, und 20 ccm 1 n-Salzsäure. Das Gemisch wurde mittels Durchströmung von Wasserstoff über Nacht von Kohlensäure befreit und zeigte dann bei elektrometrischer Messung eine Wasserstoffionenkonzentration entsprechend $p_{H^{\cdot}} = 3,87$.

Die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration wurde in gewöhnlicher Weise ermittelt und danach die Hauptlösung zubereitet durch Vermischen von

500 ccm der sauren, kohlensäurefreien Eiweißlösung,
42 „ 0,1 n-Natriumhydroxydlösung,
18 „ Wasser.

Diese Mischung gab bei elektrometrischer Messung $p_{H^{\cdot}} = 4,70$.

Die Koagulation wurde in einem 1-l-Kolben ausgeführt. Der Kolben war mit einem zum Boden reichenden Zuleitungsrohr und einem Rückflußkühler versehen. Der Rückflußkühler seinerseits war mit einer Reihe Absorptionsflaschen mit bariumchloridhaltiger Bariumhydroxydlösung verbunden. Der ganze Apparat wurde vor Anfang des Versuchs mit kohlensäurefreier Luft gefüllt, worauf die klare Bariumhydroxydlösung in die Absorptionsflaschen gebracht und endlich 300 ccm der oben erwähnten Lösung ($p_{H^{\cdot}} = 4,70$) in den Kolben gegossen wurden.

Nun wurde kohlensäurefreie Luft durch die Flüssigkeit und den ganzen Apparat während 1½ Stunden geleitet, ohne daß die Bariumhydroxyd-

[1]) Ergebnisse der Physiologie 9, 334, 1910.

lösung dadurch getrübt wurde. Danach wurde der Kolben mit der Lösung in siedendem Wasser unter wiederholtem tüchtigem Umschütteln und steter langsamer Durchleitung kohlensäurefreier Luft während 1 Stunde erhitzt, wonach gekühlt und die Durchströmung kohlensäurefreier Luft noch 2 Stunden fortgesetzt wurde. Dadurch wurde die Bariumhydroxydlösung in der ersten Absorptionsflasche ganz schwach aber deutlich getrübt.

Um den Kohlensäurewert dieser Trübung zu ermitteln, wurde ein wenig Phenolphthalein und dann vorsichtig 0,1 n-Salzsäure, bis die rote Farbe noch eben wahrnehmbar war, zugegeben. In der auf diese Weise erhaltenen Aufschwemmung von Bariumcarbonat in einer Bariumchloridlösung wurde der Carbonatgehalt durch Zugabe von 5 ccm 0,2 n-Salzsäure, Wegkochen der Kohlensäure, Abkühlung und Rücktitrieren mit 0,2 n-Natriumhydroxydlösung bestimmt. Es wurden von der letzteren 4,80 ccm verbraucht. Die beim Koagulieren entwickelte Kohlensäuremenge entspricht somit höchstens 5,00 — 4,80 = 0,2 ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung.

Ein ganz ähnliches Resultat wurde erreicht in Versuchen, bei denen die Eiweißlösung mit Milchsäure oder Essigsäure angesäuert wurde, und endlich ergab ein Kontrollversuch, bei dem ausgekochtes Wasser statt der Eiweißlösung benutzt wurde, eine Kohlensäureentwicklung von ganz derselben Größenordnung. Man darf hieraus den Schluß ziehen, daß die bei den Versuchen mit Eiweißlösungen ausgeschiedenen, ganz kleinen Bariumcarbonatmengen nicht oder nur in unwesentlichem Maße von während der Koagulation entwickelter Kohlensäure herstammen, sondern dagegen vielmehr auf Fehlerquellen bei der Versuchsanordnung, und dann natürlich besonders auf Zufuhr atmosphärischer Kohlensäure zurückzuführen sind.

Der Kolben mit dem Gerinnsel stand über Nacht im Eisschranke, wonach das bei der Koagulation verdampfte Wasser — durch Wägung des Kolbens vor und nach dem Erhitzen ermittelt — zugesetzt wurde (die Menge variierte von 0,25 bis 0,4 g). Nach gutem Schütteln wurde filtriert und die Wasserstoffionenkonzentration im Filtrat elektrometrisch gemessen. Ebenso wurde der Gesamtstickstoff der Lösung vor und nach der Koagulation bestimmt. Die gefundenen Werte, die in der Tab. XI zusammengestellt sind, zeigen, daß die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration bei den Koagulationen sowie auch die Stickstoffgehalte der Filtrate ganz den bei den früher beschriebenen Versuchen obwaltenden Verhältnissen entsprechen.

Ein nicht fernliegender Gedanke ist es, daß die hier untersuchte Änderung der Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation möglicherweise ihren Grund hat in der im folgenden Abschnitt besprochenen Dekomposition, der eine Proteinlösung durch zu lange dauerndes Erhitzen unterliegt. Es wäre des-

halb auch die Annahme nicht unbedingt zu verwerfen, daß auch selbst bei optimalen Koagulationsbedingungen und Anwendung der optimalen Koagulationsdauer eine geringfügige Spaltung eintreten und zu Reaktionsänderungen Anlaß geben könnte. Wenn dieser Umstand aber die Abhängigkeit der Reaktionsverschiebung von der Natur der anwesenden Säure erklären sollte, dann wäre man zu der Annahme gezwungen, daß auch die Art und der Umfang der Spaltung davon abhängig wäre und nicht nur von der Größe der Wasserstoffionenkonzentration, was uns wenig wahrscheinlich vorkommt. Es hat sich denn auch bei einigen unten beschriebenen Versuchen, wo wir unter anderen den Umfang der Proteinspaltung während der Koagulation durch Formoltitrierung[1]) in dem vom Gerinnsel abfiltrierten verfolgten, herausgestellt, daß die Spaltung erstens äußerst geringfügig ist, selbst wenn 1 Stunde in siedendem Wasser erhitzt wird, und zweitens daß sie ganz unabhängig von der Art und Natur der angewandten Säure ist.

Tabelle XI.

Die beim Versuch benutzte Lösung	Die beim Versuch gefundene Menge Bariumcarbonat x ccm 0,2 n-Salzsäure entsprechend x	Wasserstoffionenkonzentration		mg Gesamtstickstoff in 50 ccm		b in °/₀ von a ausgedrückt
		vor der Koagulation $p_{H^\cdot}$	nach der Koagulation $p_{H^\cdot}$	Lösung vor der Koagulation a	Filtrat nach der Koagulation b	
Eiweißlösung mit Salzsäure angesäuert	0,20	4,70	6,01	241,9	17,80	7,36
Eiweißlösung mit Milchsäure angesäuert	0,25	4,69	4,94	218,0	17,00	7,80
Eiweißlösung mit Essigsäure gesäuert	0,18	4,68	4,74	221,0	16,88	7,64
Destill. Wasser	0,20	—	—	—	—	—

Es wurden 3 Koagulationsversuche ausgeführt mit derselben Eiweißlösung als Ausgangsmaterial und mit Salzsäure, bzw. Milchsäure oder Essigsäure angesäuert. Die Versuche wurden ganz wie oben (siehe S. 408) beschrieben ausgeführt, indem man, um der vollständigen Austreibung der Kohlensäure sicher zu sein, einen Überschuß der Säure hinzufügte, dann über Nacht einen Wasserstoffstrom durchleitete, wonach es durch

[1]) Diese Zeitschr. 7, 45, 1907.

Vorversuche ermittelt wurde, wieviel Natriumhydroxyd zugefügt werden mußte, um die optimalen Koagulationsverhältnisse zu erreichen, bei denen die Hauptversuche ausgeführt sein sollten. Die Koagulationsdauer war 1 Stunde. Außer den gewöhnlichen Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration und des Stickstoffgehalts sowohl in der nicht koagulierten Lösung als auch im Filtrat vom Gerinnsel, wurde bei diesen Versuchen zugleich diejenige Menge 0,2 n-Natriumhydroxydlösung ermittelt, die 30 ccm der nicht koagulierten Lösung bzw. des Filtrats verlangten,

1. um gegen empfindliches Lackmuspapier[1]) neutral zu werden und 2. um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden.

Endlich wurde bestimmt:

3. die Menge formoltitrierbaren Stickstoffs, indem man mit Phenolphthalein bis zu stark roter Farbe titrierte, und die Lackmusneutralität als Ausgangspunkt der Berechnung nahm. Die Gegenwart der schwachen Säure, Essigsäure, in dem einen Versuch, wird unter diesen Umständen bewirken, daß die Formoltitrierungen bei diesem Versuche etwas zu hohe Resultate[2]) geben.

Die Resultate sind in der Tabelle XII eingetragen.

Tabelle XII.

Angesäuert mit	30 ccm der nicht koagulierten Lösung						30 ccm des Filtrats					Wasserstoffionenkonzentration	
	enthielten a ccm 0,2 n-Säure der zugesetzten Säure	verlangten, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden, b ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	verlangten, um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden, in allem c ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	enthielten d Milligramme Gesamtstickstoff	enthielten e Milligramme formoltitrierbaren Stickstoff	e in % von d ausgedrückt	verlangten, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden, f ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	verlangten, um mit Phenolphthalein schwach rot zu werden, g ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung	enthielten h Milligramme Gesamtstickstoff	enthielten i Milligramme formoltitrierbaren Stickstoff	i in % von h ausgedrückt	Vor der Koagulation	Nach der Koagulation
	a	b	c	d	e		f	g	h	i		$p_{H^\cdot}$	$p_{H^\cdot}$
Salzsäure	2,60	1,42	1,60	140,9	6,50	4,61	0,10	0,12	10,49	0,39	3,72	4,68	5,71
Milchsäure	2,76	1,59	1,80	130,8	6,30	4,82	0,39	0,41	10,20	0,45	4,41	4,69	4,94
Essigsäure	6,88	5,56	5,92	132,6	6,72	5,07	4,10	4,22	10,13	0,42	4,15	4,68	4,74

Aus Tabelle XII, Stab 6 und 7 ersieht man, daß die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs, wie es natürlich zu erwarten war, in allen

[1]) Dargestellt nach V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 133, 1909.

[2]) Vgl. V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 33, 1909.

drei nicht koagulierten Lösungen dieselbe ist — daß das Resultat im Versuch mit Essigsäure ein bißchen zu hoch ausfällt, ist schon oben bemerkt worden —, und in den Stäben 11 und 12 sieht man, daß dasselbe auch in betreff der Filtrate der Fall ist. Die Zahlen sind im letzteren Falle so klein, daß ihre gute gegenseitige Übereinstimmung untereinander als ein Zufall angesehen werden muß; der Einfluß der Essigsäure im dritten Versuch ist unmerklich.

Warum die Reaktionsänderung in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der angewandten Säure steht, darüber gestatten unsere Experimente nicht, uns eine sichere Auffassung zu bilden; wir meinen aber, daß die Sache in allem wesentlichen als ein Verdünnungsphänomen zu betrachten ist, eine Meinung, die durch die in der Tabelle XII aufgeführten Zahlen eine Stütze findet, und die übrigens auch eine Erklärung von einigen der früher erwähnten Verhältnisse gibt.

In der Tabelle XII, Stab 2 sind die Mengen der beim Ansäuern angewandten Säure aufgeführt, Zahlen, die aus den bei der Zubereitung der Hauptlösung benutzten Mengen Eiweißlösung, Säure, Natriumhydroxydlösung und Wasser leicht zu berechnen sind. Betrachtet man jetzt den Versuch mit Salzsäure, so findet man dort in 30 ccm Lösung in allem 2,60 ccm — durch zugefügtes Natriumhydroxyd nicht neutralisierte — Salzsäure (Stab 2), es sind aber, um eine schwach rote Farbe mit Phenolphthalein hervorzurufen, 1,60 ccm 0,2 n-Natriumhydroxyd nötig (Stab 4). Man könnte dadurch versucht sein, zu glauben, daß (2,60 — 1,60) = 1,00 ccm Salzsäure zur Neutralisation der in der Eiweißlösung gegenwärtigen, basisch reagierenden Salze, z. B. Carbonaten, verbraucht waren, während 1,60 ccm Salzsäure an das Protein gebunden waren, und von dieser Kombination von Salzsäure und Protein müßte dann die saure Reaktion der Lösung ($p_{H^{\cdot}} = 4{,}68$) herrühren. So kann aber die Sache nicht liegen; denn durch die Koagulation wird, wie wir es durch die oben beschriebenen Versuche dargetan haben, nur Protein, aber keine Salzsäure, ausgefällt, weshalb letztere im Filtrate wiedergefunden werden müßte. Das Filtrat müßte dann wahrscheinlich eine stärker saure Reaktion besitzen als die nicht koagulierte Lösung, während der Versuch hingegen zeigt, daß das Gegenteil der Fall ist. Ebenfalls müßte das Filtrat, um mit Phenolphthalein eine schwach rote Farbe zu erhalten, einen reichlichen Zusatz von Natriumhydroxyd ver-

langen; der Versuch zeigt aber nur einen Verbrauch von 0,12 ccm Natriumhydroxydlösung (Tabelle XII, Stab 9).

Die erhaltenen Resultate werden indessen leicht verständlich, wenn man annimmt, daß die ganze — oder beinahe die ganze — Salzsäuremenge zur Neutralisation der in der Eiweißlösung anwesenden, alkalisch reagierenden Salze gebraucht worden ist, und daß die saure Reaktion der Lösung, jedenfalls der Hauptsache nach, von dem sauren Charakter des reinen Proteins herrührt. Bekanntlich sind sowohl die Proteine als auch deren Spaltungsprodukte von amphoterer Natur; bei Zusatz von Säuren wirken sie als Basen, bei Zusatz von Basen dagegen als Säuren. Eine wässerige Lösung eines reinen Proteins wird je nach dem angewandten Protein einen etwas verschiedenen Charakter haben. Was die früher als neutral angesehenen Proteine anbelangt, so muß man sagen, daß, wenn auch die Anzahl der basischen Gruppen der der sauren Gruppen entspricht, so sind die Dissoziationskonstanten der letzteren weit größer als die der basischen Gruppen, infolgedessen wirken solche Proteine wie Eieralbumin und Serumalbumin im großen und ganzen wie schwache Säuren.

Es ist nichts Auffallendes, daß Lösungen solcher schwachen Säuren, die schwach basische Gruppen enthalten, bedeutende Basenmengen verlangen, um gegen Lackmuspapier neutral zu werden (1,42 ccm, Stab 3), und ebensowenig Auffallendes hat es, daß noch mehr von der Base erforderlich ist, ehe die rote Farbe des Phenolphthaleins auftritt (1,60 ccm, Stab 4). Ganz analoge Verhältnisse sind bei den Aminosäuren, bei den Peptonen und ganz besonders bei dem einzigen in dieser Beziehung untersuchten Polypeptid, dem Glycylglycin[1]), bekannt.

Weil nun durch die Koagulation der allergrößte Teil des Proteins, das heißt der schwachen Säure, die die Wasserstoffionenkonzentration der Lösungen bedingt, ausgefällt wird, so ist es natürlich, daß diese letztere Konzentration mit dem Stickstoffgehalt gleichzeitig, wenn auch nicht proportional, vermindert wird. In dem in der Tabelle XII aufgeführten Versuch mit Salzsäure findet sich im Filtrate nur $^1/_{12}$ bis $^1/_{14}$ der

[1]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 31, 1909.

ursprünglichen Stickstoffmenge, während die Wasserstoffionenkonzentration desselben etwa 10mal kleiner ist als in der nicht koagulierten Lösung ($p_{H^{\cdot}}$ = 5,71 bzw. 4,68).

Wir sind uns wohl bewußt, daß eine Eiweißlösung wie diejenige, mit der wir gearbeitet haben, ein Gemisch von mehreren Proteinen enthält und daß die Hauptmenge der nicht koagulablen Stickstoffkörper von ganz anderer Natur (Mucoiden) ist als das koagulable Protein. Was die oben erwähnten Betrachtungen anbelangt, hat das aber kaum etwas zu bedeuten, da sämtliche gegenwärtige Proteine in den hier besprochenen Beziehungen sich ganz in derselben Weise zu verhalten scheinen. Die Abnahme des Stickstoffgehalts während der Koagulation wird von einer ganz entsprechenden Abnahme des Gehalts an formoltitrierbarem Stickstoff und des Verbrauchs an Natronlauge zur Erreichung der Lackmusneutralität und der roten Farbe mit Phenolphthalein begleitet.

Wenden wir uns jetzt zu dem Versuch mit Essigsäure, dann sehen wir, daß von der zugegebenen Essigsäuremenge (6,88 ccm, Tabelle XII, Stab 2) eine mit der Salzsäuremenge (2,60 ccm) äquivalente Menge verbraucht wird, um mit den anwesenden Carbonaten normale Acetate zu bilden. Es restieren dann (6,88 — 2,60) = 4,28 ccm 0,2 n-Essigsäure, die nach der Koagulation beim Titrieren des Filtrats bis auf schwach rote Farbe mit Phenolphthalein wiedergefunden werden (gefunden: 4,22 ccm, Stab 9; beim Titrieren solcher schwachen Säuren wie Essigsäure bis zur neutralen Reaktion gegen Lackmuspapier bekommt man, wie bekannt, aus leichtverständlichen Gründen zu niedrige Resultate). In derselben Weise wird die nicht koagulierte Lösung, um mit Phenolphthalein rot zu werden, die mit der überschüssigen Essigsäure äquivalente (4,28 ccm) plus die der Reaktionsänderung des Proteins entsprechende (1,60 ccm) (s. S. 429) Menge Natriumhydroxydlösung, zusammen 5,88 ccm, verlangen (gefunden: 5,92 ccm, Stab 4).

Weiter ist es leicht verständlich, daß es, um der Proteinlösung eine $p_{H^{\cdot}}$ = 4,68 entsprechende Wasserstoffionenkonzentration beizubringen, notwendig ist, mehr Essigsäure als Salzsäure hinzusetzen. Während nämlich die gebildeten Chloride neutral reagieren und deshalb nur eine ganz kleine Spur eines Salzsäureüberschusses verlangen, um im Verein mit dem schwach sauren Protein die des öfteren erwähnte optimale Wasserstoffionenkonzentration in der betreffenden Lösung hervorzurufen, so reagieren die gebildeten Acetate, dank der hydrolytischen

Spaltung, stark alkalisch, dermaßen, daß erst ein Gemisch von Acetat und reichlicher Essigsäure zusammen mit dem Proteine die gewünschte optimale Wasserstoffionenkonzentration gibt. Dieses Gemisch von Acetat und Essigsäure wirkt nun bei der Koagulation wie ein „Puffer“[1]), und zwar so, daß die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration wegen des Auskoagulierens des Proteins nur ganz wenig merkbar wird.

Betreffs des Versuchs mit Milchsäure lassen sich ganz ähnliche Betrachtungen und Berechnungen geltend machen; die Milchsäure ist aber eine weit stärkere Säure als die Essigsäure, weshalb der notwendige Überschuß an jener auch nur sehr klein ist (2,76 — 2,60 = 0,16 ccm). Das Gemisch von Lactat und Milchsäure wirkt somit nur in kleinerem Maße als Puffer bei der Koagulation, bei der, wenn auch weit weniger scharf ausgesprochen als bei der Salzsäure, eine deutliche Reaktionsänderung in alkalischer Richtung stattfindet.

Betrachtet man somit die Wasserstoffionenkonzentrationsänderung bei der Koagulation als von einer Konzentrationsabnahme des Proteingehalts herrührend, so versteht man leicht den im vorhergehenden (siehe Tabelle X und S. 419) angedeuteten Zusammenhang zwischen der für die Koagulation optimalen Wasserstoffionenkonzentration und der Proteinkonzentration. Erinnert man sich nämlich, daß nur das Protein selbst, nicht aber ein Salz desselben auskoaguliert, dann muß man wahrscheinlich erwarten, daß die günstigsten Koagulationsbedingungen des amphoteren Proteins dann vorhanden sein werden, wenn weder an Säure noch an Base ein Überschuß vorhanden ist, mit dem das Protein ein Salz bilden könnte. Handelt es sich nun, wie bei allen hier beschriebenen Versuchen, wo mit Salzsäure angesäuert wurde, nur um starke Säuren oder Basen, dann wird folglich unter optimalen Koagulationsbedingungen die Lösung nur neutrale Salze nebst einem oder mehreren Proteinkörpern enthalten, und es wird demgemäß die Konzentration der letzteren für die Wasserstoffionenkonzentration maßgebend sein. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration wird somit desto größer — das entsprechende

[1]) Diese Zeitschr. 21, 187, 1909.

$p_{H^{\cdot}}$ demzufolge desto kleiner — sein, je größer die Konzentration der vorliegenden Proteinlösung ist.

Wie schon früher (S. 419) hervorgehoben worden ist, finden Michaelis und Rona, daß „der isoelektrische Punkt" des Serumalbumins bei etwa $0{,}3 \times 10^{-5}$ (dem $p_{H^{\cdot}} = 5{,}52$ entsprechend), d. h. bei einer bedeutend niedrigeren Wasserstoffionenkonzentration als der von uns für die Koagulation gefundenen Optimalkonzentration, liegt. Vielleicht findet dieses Verhältnis seine Erklärung dadurch, daß Michaelis und Rona gewöhnlich mit denaturierten Proteinen gearbeitet und immer, soweit es aus ihren Angaben ersichtlich ist, weit schwächere Proteinlösungen oder Aufschwemmungen angewendet haben, als die bei unseren Versuchen benutzten.

Es ist ebenfalls im vorhergehenden (S. 419) darauf aufmerksam gemacht worden, daß ein Salzzusatz die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration ein wenig gegen die saure Seite hin zu verschieben scheint; vielleicht findet man, den obigen Anführungen gemäß, die Erklärung in der von Arrhenius[1]) gefundenen Tatsache, daß die Gegenwart von Neutralsalzen die Dissoziationskonstante schwacher Säuren — in diesem Falle die Konstante des als Säure wirkenden Proteinstoffes — erhöht.

Vollständigkeitshalber und um Mißverständnissen vorzubauen mögen noch ein paar Bemerkungen hinzugefügt werden.

Wenn die für die Koagulation optimale Wasserstoffionenkonzentration mit der einer wässerigen Lösung des reinen Proteins zusammenfällt, dann darf man erwarten, daß durch Dialyse gereinigte, salzfreie Proteinlösungen keinen Säurezusatz verlangen werden, um optimale Koagulationsbedingungen zu geben. Bei den früher beschriebenen Versuchen mit durch Dialyse gereinigten Eiereiweißlösungen haben wir indessen eine gar nicht unbedeutende Säuremenge zugeben müssen, um optimale Koagulationsverhältnisse zu erzielen. Die Ursache davon ist gewiß darin zu suchen, daß die von uns benutzten Eiweißlösungen noch nicht rein gewesen sind, indem, wie W. Pauli und R. Wagner[2]) neuerdings bemerkt haben, die Anionen sich viel leichter als die Kationen aus einer salzhaltigen Eiweißlösung

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. 31, 197, 1899.

[2]) Diese Zeitschr. 27, 300, 1910.

durch Dialyse entfernen lassen, und zwar, weil der basische Charakter der Proteine viel weniger ausgesprochen als der saure ist. Wir haben demnach wahrscheinlich mit Eiweißlösungen gearbeitet, die von basischen Stoffen noch nicht befreit waren, und solche Lösungen verlangen selbstverständlich einen angemessenen Säurezusatz, um die Optimalwasserstoffionenkonzentration zu erreichen.

Auch müssen wir noch einem im vorhergehenden erwähnten Verhältnisse (s. S. 417) ein wenig weitere Aufmerksamkeit widmen. Es hat sich bei 3 Versuchsreihen mit Eiereiweiß von verschiedenem Verdünnungsgrad herausgestellt, daß die optimale Salzsäuremenge nicht der angewandten Menge Eiweißlösung ganz proportional war — was man ja erwarten mußte, wenn die einzige Aufgabe der Salzsäure die war, die in der Eiweißlösung anwesenden Carbonate zu neutralisieren —, sondern ein wenig stärker zunahm als die Proteinkonzentration. Dieses könnte darauf hindeuten, daß die Optimalwasserstoffionenkonzentration nicht ausschließlich durch den dem Proteine eigenen sauren Charakter bedingt ist, sondern daß auch noch ein — vielleicht ganz außerordentlich kleiner — Überschuß an Salzsäure notwendig ist. Die erwähnte Tatsache läßt sich indessen auch anders erklären, indem ein Gehalt an schwachen Säuren sich eben in dieser Weise bemerkbar machen würde, und eine durch Dialyse nicht gereinigte Eiweißlösung enthält ja z. B. Phosphate.

Immerhin betrachten wir aber nicht die hier erörterte Frage als eine endgültig erledigte, und wir haben uns deshalb im vorhergehenden immer auch mit einigem Vorbehalt ausgedrückt, indem wir aus unseren Versuchen nur die folgenden Schlüsse gezogen haben:

1. Es ist anzunehmen, daß die für die Koagulation einer reinen Proteinlösung optimale Wasserstoffionenkonzentration im wesentlichen diejenige ist, die der saure Charakter des Proteins der Lösung verleiht, oder anders gesagt, die optimale Wasserstoffionenkonzentration ist im wesentlichen nichts anderes als diejenige, die eine Lösung von reinem Proteinstoff in reinem Wasser als Folge der elektrolytischen Dissoziation des Proteins erhält, und sie ist deshalb von der Konzentration des Proteins abhängig.

2. Die durch die Koagulation bewirkte Änderung der Wasserstoffionenkonzentration rührt von der Änderung der Proteinkonzentration her.

Bei der weiteren Bearbeitung der in dieser Abhandlung behandelten Fragen beabsichtigen wir, möglichst salzfreie Lösungen von möglichst reinen Proteinstoffen anzuwenden, und zwar, weil die Versuchsbedingungen unter solchen Umständen leichter nach Wunsch variiert werden können und die erhaltenen Resultate wahrscheinlich übersichtlicher werden. Wir sind indessen nicht blind dagegen, daß, je reiner die Proteinlösung dargestellt wird und je vollständiger die als „Puffer“ wirkenden Körper entfernt werden, um so empfindlicher Säure- oder Basezusatz gegenüber die Proteinlösung sich zeigen wird, so daß es notwendig sein wird, eine möglichst genaue Methodik zu verwenden.[1])

C. Einfluß der Koagulationsdauer.

Beim Erwärmen eines koagulierten Albumins in neutraler, schwach saurer oder schwach alkalischer, wässeriger Lösung tritt nach und nach eine Spaltung, unter Bildung löslicher, stickstoffhaltiger Körper ein. Der Umfang dieser Spaltung hängt von der Temperatur, der Dauer des Erwärmens, der Wasserstoffionenkonzentration der Flüssigkeit und wahrscheinlich noch von mehreren Faktoren ab. Es ist somit einleuchtend, daß, wenn es sich um eine möglichst vollständige Ausscheidung koagulabler Stickstoffverbindungen handelt, auch die Koagulationsdauer ein nicht zu vernachlässigender Faktor ist. Bei einem zu kurzen Erwärmen geschieht es zuweilen, daß die Ausscheidung nicht vollständig wird, und erwärmt man zu lange, dann kann man Gefahr laufen, daß einmal ausgeschiedene Stickstoffkörper wieder in Lösung gehen.

Schon in der Einleitung ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß die Koagulation eines Serums schon durch eine $^1/_4$ bis $^1/_2$stündige Erwärmung in siedendem Wasser vollständig wird, während Eiweißlösungen sich ganz anders verhalten.

---

[1]) Wir lenken in dieser Beziehung die Aufmerksamkeit auf einige zutreffende Bemerkungen in ähnlicher Richtung von W. Pauli und R. Wagner, diese Zeitschr. 27, 302, 1910.

Einige Versuchsreihen, die diese Verhältnisse beleuchten, sollen in diesem Abschnitt eine nähere Erwähnung finden.

Tabelle XIII enthält die Ergebnisse zweier Versuchsreihen mit Serum, das ziemlich stark durch Hämoglobin verfärbt war. Die erste Reihe bezieht sich auf ein Serum, das 234 mg Stickstoff in 20 ccm enthielt und mit Schwefelsäure angesäuert wurde. Bei der anderen Reihe wurde ein Serum benutzt, das in 20 ccm 202 mg Stickstoff enthielt und mittels Essigsäure angesäuert wurde. In beiden Reihen wurden für jeden Versuch 20 ccm Serum, a ccm 0,1 n-Säure nebst (55 — a) ccm Wasser genommen; übrigens war die Versuchsanordnung die gewöhnliche.

Tabelle XIII.

Koagulation von Serum in verschiedenen Zeiten nach Zusatz von Schwefelsäure bzw. Essigsäure.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Schwefelsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in			Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Essigsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in		
		1/4 Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg			1/4 Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg
1	7	4,51	4,66	5,35	9	7	5,40	6,12	8,15
2	8	3,99	—	4,79	10	8	4,28	4,78	6,19
3	9	3,86	3,92	4,62	11	9	3,70	3,91	4,72
4	10	3,84	3,91	4,73	12	10	3,39	3,50	4,12
5	11	3,89	4,02	4,89	13	11	3,21	3,31	3,99
6	12	4,00	4,22	5,26	14	12	3,22	3,31	4,00
7	13	4,20	4,62	5,78	15	13	3,22	3,30	3,98
8	14	4,60	5,00	6,27	16	14	3,31	3,38	4,11

Die Tabelle zeigt, daß das Filtrat nach 1 stündigem Erwärmen mehr, wenn auch nur wenig mehr, Stickstoff als nach $^1/_4$ stündigem Erwärmen enthielt, und nach einer Koagulationsdauer von 3 Stunden sind die für den Stickstoffgehalt des Filtrats gefundenen Werte bedeutend zu hoch. In der Versuchsreihe mit Essigsäure liegt der Optimalpunkt beim Versuch Nr. 14 und scheint durch eine Verlängerung der Koagulationsdauer nicht geändert zu werden. Die Versuchsreihe mit Schwefelsäure hat ihr Optimum im Versuch Nr. 4, bei $^1/_4$ stündiger Erwärmung; bei 3 stündiger Erwärmung dagegen scheint das Optimum ein wenig gegen die alkalische Seite hin verschoben. Es ist indes hier nur von so kleinen Abweichungen der ge-

fundenen Werte die Rede, daß die scheinbare Verschiebung sich leicht durch Versuchsfehler erklären läßt; wir haben nur deshalb darauf aufmerksam gemacht, weil Eiereiweißlösungen sich entgegengesetzt verhalten zu können scheinen (siehe S. 439).

Da der Unterschied der Koagulationszeiten in den hier beschriebenen 2 Versuchsreihen ziemlich groß ist, so machten wir einige ergänzende Versuche, teils mit Serum, teils mit Eiweißlösung, in denen dieser Unterschied weit kleiner war und wo in sämtlichen Versuchen die für die Koagulation optimale Salzsäuremenge als Säuerungsmittel angewandt wurde.

In der ersten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

40 ccm rotes Serum (445 mg Stickstoff enthaltend),
20 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_{H^{\cdot}} = 4{,}66$.

In der zweiten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

50 ccm Eiweißlösung (266 mg Stickstoff enthaltend),
10 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_{H^{\cdot}} = 4{,}69$.

In der dritten Reihe wurden für jeden Versuch benutzt:

50 ccm Eiweißlösung (271 mg Stickstoff enthaltend),
10 „ 0,1 n-Salzsäure,
10 „ Wasser,
70 ccm.

Vor der Koagulation wurde gemessen $p_{H^{\cdot}} = 4{,}69$.

Das Verfahren war im übrigen wie gewöhnlich. Es wurde auf 100 ccm verdünnt und der Stickstoffgehalt von 50 ccm des Filtrats bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle XIV zusammengestellt.

Aus Tabelle XIV ersieht man deutlich, daß für Serum die optimale Koagulationsdauer etwa $^1/_2$ Stunde ist, daß aber Variationen von $^1/_4$ bis 1 Stunde ohne Belang sind. Betreffs der Eiereiweißlösungen sieht man, daß in beiden Versuchsreihen das Filtrat stets ärmer an Stickstoff wird, je länger die Koagulationsdauer wird.

Tabelle XIV.

Koagulation von Serum bzw. Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten nach Zusatz von Salzsäure.

Erste Reihe (Serum)			Zweite Reihe (Eiweiß)			Dritte Reihe (Eiweiß)		
Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg	Versuchs-Nr.	Koagulationsdauer Min.	Gesamtstickstoff in 50 ccm d. Filtrats mg
17	5	12,20	25	5	16,65	33	10	13,12
18	10	6,95	26	10	—	34	20	10,38
19	15	6,50	27	15	12,25	35	30	9,13
20	20	6,48	28	20	11,12	36	45	8,30
21	30	6,45	29	25	10,52	37	60	7,88
22	60	6,51	30	30	10,02	38	90	7,25
23	90	6,70	31	40	9,60	39	120	7,00
24	120	7,00	32	60	8,63	40	180	6,26

Um das Verhalten der Eiweißlösungen in dieser Beziehung noch etwas weiter zu erforschen, haben wir außer einigen orientierenden Versuchen, die hier nicht weiter erwähnt werden sollen, 2 Versuchsreihen angestellt, deren Ergebnisse in den Tabellen XV und XVI zusammengestellt sind. In beiden Reihen kam Salzsäure als Säuerungsmittel zur Anwendung, und es wurde bei 6 verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen und in verschiedenen Zeiten koaguliert. Für jeden Versuch kamen 50 ccm Eiweißlösung (die in erster Reihe 266 mg, in zweiter 264 mg Gesamtstickstoff enthielt), a ccm 0,1 n-Salzsäure und (20 — a) ccm Wasser zur Anwendung. Das Verfahren sonst wie üblich; es wurde auf 100 ccm verdünnt und der Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats bestimmt.

Tabelle XV.

Koagulation von Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in						
		1/2 Std. mg	1 Std. mg	2 Std. mg	4 Std. mg	6 Std. mg	8 Std. mg	10 Std. mg
41	9,0	13,65	12,95	13,31	13,51	13,51	13,84	13,76
42	10,0	10,25	9,18	8,56	8,07	8,20	8,21	8,51
43	10,5	10,14	8,88	8,10	7,92	7,10	7,59	7,84
44	11,0	10,58	9,32	8,66	8,14	7,27	7,59	8,14
45	11,5	12,06	10,80	10,51	9,77	9,25	9,25	9,25
46	12,0	13,10	11,91	11,78	11,18	10,92	11,03	11,03

Tabelle XVI.

Koagulation von Eiweißlösungen in verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen.

Versuchs-Nr.	Angewandte Menge (a) 0,1 n-Salzsäure ccm	Gesamtstickstoff in 50 ccm des Filtrats nach Koagulation in				
		$^1/_4$ Std. mg	1 Std. mg	3 Std. mg	8 Std. mg	12 Std. mg
47	9,0	15,71	15,43	15,47	15,90	16,80
48	10,0	13,39	11,17	10,30	10,83	11,84
49	10,5	12,47	9,69	8,88	9,24	10,32
50	11,0	13,10	9,47	8,44	8,21	9,03
51	11,5	14,28	10,66	9,84	9,03	9,18
52	12,0	15,50	12,20	10,92	10,55	10,40

Aus den Tabellen XV und XVI, besonders deutlich aus der letzteren, ersieht man, daß der Minimumwert des Gehalts an nicht koagulablen Stickstoffkörpern — ein Wert, der von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängt — desto schneller erreicht wird, je weniger sauer die Lösung ist. In Versuch Nr. 47 ist der Minimumwert schon nach Verlauf von 1 Stunde erreicht, in Nr. 48 und 49 erst nach Verlauf von 3 Stunden, in Nr. 50 und 51 erst nach Verlauf von 8 Stunden, und endlich in Nr. 52 gibt eine Erwärmungsdauer von 12 Stunden den niedrigsten Wert für den Gehalt an nicht koagulierbaren Stickstoffverbindungen. Die Ursache hierzu ist nicht bestimmt anzugeben, wahrscheinlich spielt es aber eine Rolle, daß die Wasserstoffionenkonzentration sich während der Koagulation nach der alkalischen Seite hin verschiebt (bei langer Erwärmung wirkt das Alkali des Glases in derselben Richtung), wodurch die sauersten Lösungen nach und nach die optimale Wasserstoffionenkonzentration bekommen, während die weniger sauren Lösungen entweder alkalisch oder wenigstens so schwach sauer werden, daß eine Spaltung und eine Lösung des einmal Auskoagulierten eintreten.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration der Koagulation liegt, was die erste Versuchsreihe (Tabelle XV) betrifft, für sämtliche Koagulationszeiten bei Versuch Nr. 43. Betreffs der anderen Reihe (Tabelle XVI) findet man die optimale Wasserstoffionenkonzentration bei dem entsprechenden Versuch Nr. 49, wenn die Koagulationsdauer $^1/_4$ Stunde ist; für die übrigen Koagulationszeiten dagegen besitzt die ein wenig saurere Lösung

in Nr. 50 die optimale Wasserstoffionenkonzentration. Wird somit die Koagulationsdauer verlängert, so scheint also der Optimalpunkt sich etwas gegen die saure Seite hin zu verschieben (vgl. S. 435); erinnert man sich, daß die Wasserstoffionenkonzentration während der Koagulation kleiner wird, so ist auch dieses Verhältnis leicht zu verstehen.

Vollständigkeitshalber möchten wir anführen, daß wir größere Mengen der den Gemischen Nr. 49 und 50 entsprechenden Lösungen dargestellt und in denselben die Wasserstoffionenkonzentration elektrometrisch gemessen haben, und zwar sowohl vor der Koagulation als auch in den Filtraten, die wir nach Koagulation in gegebener Zeit, Kühlung, Verdünnung mit Wasser in demselben Verhältnis wie in den Versuchen Nr. 49 und 50 und nachfolgender Filtrierung gewonnen haben.

Nr. 49.	Vor der Koagulation	. . . .	$p_{H^{\cdot}} = 4{,}68$
	Nach „ „	in $^1/_4$ Stunde	$p_{H^{\cdot}} = 5{,}51$
	„ „ „	„ 1 „	$p_{H^{\cdot}} = 5{,}62$
Nr. 50.	Vor „ „	. . . .	$p_{H^{\cdot}} = 4{,}50$
	Nach „ „	in 1 Stunde	$p_{H^{\cdot}} = 5{,}33$

Aus den hier beschriebenen Versuchen geht hervor, daß bei der Wärme eines Wasserbades die Ausscheidung der koagulierbaren Proteinstoffe einer Eiereiweißlösung, oder jedenfalls einiger derselben, eine ziemlich beträchtliche Zeit erfordert, und daher wahrscheinlich mit chemischen Veränderungen oder Umlagerungen innerhalb des Proteinstoffmoleküls verknüpft sein muß. Die Versuche zeigen einen großen Unterschied zwischen Serum und Eiweißlösungen; dieser wird aber vielleicht eher als ein Unterschied zwischen den Umlagerungsgeschwindigkeiten während der Gerinnung aufzufassen sein.

Daß es bei der Koagulation von Eiweißlösungen sich wirklich um einen doppelten Prozeß handelt, und zwar teils um eine Ausfällung koagulabler Proteinstoffe und teils um eine Wiederauflösung unter hydrolytischer Spaltung derselben, das konnten wir durch die unten beschriebene Versuchsreihe leicht nachweisen.

Bei sämtlichen Versuchen wurde dieselbe Eiweißlösung benutzt. Sie wurde zuerst mit ganz wenig überschüssiger Salzsäure angesäuert, mittels Wasserstoffdurchleitung von Kohlensäure befreit und nachher mit

Natriumhydroxyd bis zur Erreichung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration versetzt. Von der auf diese Weise zubereiteten Lösung wurden Proben in siedendem Wasser in verschieden langen Zeiten unter wiederholtem Umschütteln erwärmt und dadurch koaguliert. Sowohl in der nicht koagulierten Lösung als auch in den Filtraten vom Gerinnsel wurde die Wasserstoffionenkonzentration, der Gesamtstickstoff, der Gehalt an formoltitrierbarem Stickstoff und der Verbrauch an 0,2 n-Natriumhydroxydlösung sowohl bis zur Lackmusneutralität als auch bis zur schwach roten Farbe mit Phenolphthalein ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle XVII wiedergegeben.

Tabelle XVII.

Koagulationsdauer in Stunden	40 ccm Lösung					Die Wasserstoffionenkonzentration p_H
	verbrauchten, um Lackmuspapier gegenüber neutral zu werden, a ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung a	verbrauchten, um mit Phenolphthalein schwach rote Farbe anzunehmen, in allem b ccm 0,2 n-Natriumhydroxydlösung b	enthielt c mg Gesamtstickstoff c	enthielt d mg formoltitrierbaren Stickstoff d	d in % von c ausgedrückt	
Die nicht koagulierte Lösung	1,86	2,08	181,7	8,34	4,59	4,70
1 Stunde	0,13	0,15	11,83	0,48	4,06	5,41
3 Stunden	0,14	0,18	10,58	0,64	6,05	5,43
6 „	0,15	0,20	10,49	0,98	9,34	5,53
12 „	0,21	0,28	12,95	1,79	13,82	5,52
24 „	0,22	0,40	17,18	2,94	17,11	5,60

Der vierte Stab der Tabelle läßt deutlich hervorgehen, daß nach 1stündigem Erwärmen die Koagulation nicht vollständig ist; erst nach 3 bis 6stündiger Erwärmung erreicht der Stickstoffgehalt des Filtrats ein Minimum. Aus dem zweiten, dritten und fünften Stab der Tabelle ist aber außerdem zu ersehen, daß sowohl die zur Neutralisation erforderliche Menge Natriumhydroxyd als auch die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffes ganz allmählich zunehmen, ob die Koagulation beendet ist oder nicht.

Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs steigt, wie es aus dem sechsten Stabe der Tabelle hervorgeht, in weit stärkerem Maße als die des Gesamtstickstoffs, was seine natür-

liche Erklärung dadurch findet, daß es nicht nur das Gerinnsel, sondern wahrscheinlich besonders die in Lösung befindlichen Körper sind, die, durch verlängerte Erwärmung gespalten, weiter hydrolysiert werden.

Daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht stetig sinkt, sondern bei fortgesetzter Erwärmung sich einigermaßen konstant erhält, wird leicht zu verstehen sein, wenn man bedenkt, daß durch diese eine Auskoagulation des Proteins verhindert wird, während von einer Lösung des Gerinnsels unter hydrolytischer Spaltung, das heißt unter Bildung von gleichvielen Amino- und Carboxylgruppen, anzunehmen ist, daß sie die Wasserstoffionenkonzentration entweder vergrößert oder doch wenigstens dazu beiträgt, sie konstant zu erhalten.

Übrigens wollen wir uns aller Betrachtungen über das Wesen des Koagulationsprozesses enthalten und schließlich nur noch einen kleinen, leicht ausführbaren, aber sehr lehrreichen Versuch anführen, der zeigt, daß auch Adsorptionsphänomene bei der Auskoagulation eine Rolle spielen.

Für den Versuch wurde angewandt eine Mischung von:

600 ccm etwa 4%iger Eiweißlösung,
120 „ 0,1 n-Salzsäure und
120 „ Wasser.

Diese Mischung hatte die für die Koagulation optimale Konzentration der Wasserstoffionen, indem $p_{H^\cdot} = 4{,}69$ gefunden wurde.

400 ccm der Mischung wurden durch ½stündiges Erhitzen in siedendem Wasser koaguliert, und dann in kaltem Wasser ½ Stunde gekühlt, wonach etwa 200 ccm abfiltriert wurden.

30 ccm dieses Filtrates enthielten 8,62 mg N.

Danach wurden die folgenden 3 Flüssigkeiten 2 Stunden in siedendem Wasser erwärmt:

a) 50 ccm des Filtrats ohne jeglichen Zusatz,

b) 50 ccm des Filtrats, die mit etwas vom Gerinnsel versetzt worden waren, und

c) der Rest der Hauptportion, in dem der weitaus größte Teil des Gerinnsels sich noch befand.

Nach der 2stündigen Erwärmung wurden die 3 Portionen filtriert, wonach der Gesamtstickstoff in 30 ccm der Filtrate ermittelt wurde.

30 ccm	des	Filtrats	von	Versuch	a)	enthielten	8,50 mg N
30 „	„	„	„	„	b)	„	7,98 „ „
30 „	„	„	„	„	c)	„	5,50 „ „

Ein anderer Versuch, der mit 400 ccm derselben Mischung in ganz derselben Weise ausgeführt wurde, nur mit dem Unterschiede, daß das Abfiltrieren der 200 ccm unmittelbar nach dem $^1/_2$stündigen Erwärmen ohne Abkühlung stattfand, hat ganz ähnliche Resultate gegeben:

30 ccm	des ersten Filtrats (die ca. 200 ccm)				enthielten	9,60 mg N
30 „	„	Filtrats	vom Versuch	a)	„	9,44 „ „
30 „	„	„	„	b)	„	8,92 „ „
30 „	„	„	„	c)	„	5,82 „ „

Aus diesen 2 Versuchen geht hervor, daß, wenn das durch Erwärmung in der ersten halben Stunde gebildete Gerinnsel abfiltriert wird, so kann das Filtrat weiter erwärmt werden, ohne daß, praktisch genommen, dadurch mehr Gerinnsel gebildet wird. Versetzt man dagegen das Filtrat mit etwas vom abfiltrierten Gerinnsel, um dann aufs neue zu erwärmen und zu filtrieren, so wird der Gesamtstickstoff des Filtrats deutlich vermindert, und erwärmt man in Gegenwart von reichlichen Mengen des Gerinnsels, dann erleidet der Stickstoffgehalt der Lösung sogar eine sehr bedeutende Abnahme.

Zur Kenntnis der Reduktionsfermente.

I. Mitteilung.

Über das Schardinger-Enzym (Perhydridase).

Von

A. Bach.

(Privatlaboratorium Genf.)

(Eingegangen am 24. Februar 1911.)

Die Fähigkeit organischer Materien tierischer und pflanzlicher Herkunft, Nitrate in Nitrite überzuführen, wurde von Schönbein[1]) bereits im Jahre 1861 beobachtet und mit den katalytischen Eigenschaften dieser Materien dem Hydroperoxyd gegenüber in Zusammenhang gebracht. Er hob hervor, daß die Blutkörperchen, die in bekannter Weise auf Hydroperoxyd katalytisch einwirken, auch Nitrate zu Nitriten reduzieren, und daß die katalytischen Eigenschaften beider Arten durch Blausäure in gleicher Weise aufgehoben werden.

Zahlreiche Forscher beschäftigten sich seitdem mit den reduzierenden Eigenschaften der Zellen, es herrscht aber bisher auf diesem Gebiet die größte Verwirrung und Unsicherheit. Während die einen (Rey-Pailhade, Pozzi-Escot, Abelous und seine Mitarbeiter) an die Existenz reduzierender Fermente glauben, sehen die anderen (Heffter und seine Mitarbeiter, Kastle und Elvove) die beobachteten Reduktionserscheinungen als nichtfermentative Prozesse an. Die Sachlage wird hinreichend schon dadurch charakterisiert, daß C. Oppenheimer[2]) in seinem ausgezeichneten Lehrbuch den Reduktionsfermenten nur einige Zeilen widmet, in denen er die Existenz derartiger Fermente in Abrede stellt. Hier ist nicht der Ort, auf die kritische Besprechung des sehr umfangreichen Materials einzugehen. Hervorgehoben sei nur eine grundlegende, von Schardinger[3]) herrührende Beobachtung, die

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 84, 193. 1861. Zeitschr. f. Biol. 3, 140.

[2]) Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1909.

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 5, 22, 1902. Chem.-Zeitg. 28, 704, 1904.

meiner Ansicht nach den Schlüssel zum Verständnis der im Pflanzen- und Tierkörper sich abspielenden fermentativen Reduktionsvorgänge gibt.

Schardinger stellte fest, daß frische Kuhmilch, die für sich auf Methylenblau, Natriumindigosulfonat usw. bei 70° ohne Einwirkung ist, in Gegenwart von Formaldehyd oder Acetaldehyd diese Farbstoffe zu den entsprechenden Leukobasen rasch reduziert. Mit gekochter Milch bleibt die Reaktion völlig aus. In einer sorgfältig ausgeführten Arbeit wies R. Trommsdorff[1]) nach, daß die Schardinger-Reaktion durch ein in der Milch präformiertes Ferment, und nicht durch irgend ein Produkt der bakteriellen Wirkung, ausgelöst wird, da auch völlig keimfrei ermolkene Milch diese Reaktion gibt. Andererseits reduziert unter Umständen mit Bakterien infizierte Milch Methylenblau auch in Abwesenheit von Aldehyden. Daraus ergibt sich, daß das Schardinger-Enzym mit der sogenannten „Reduktase" nicht identisch ist, da es nur in Anwesenheit von Aldehyden reduzierend wirkt. Trommsdorff bemerkt dazu, daß durch die Feststellung dieser Tatsachen für das Verständnis der Schardingerschen Reaktion noch gar nichts gewonnen war. Diese Schlußfolgerung ist indessen nur dann richtig, wenn man die Reaktion vereinzelt betrachtet. Berücksichtigt man aber die bereits auf dem Gebiete der Oxydationsfermente gemachten Erfahrungen einerseits und einige rein chemische Reduktionsvorgänge andererseits, so kommen hier höchst interessante Analogien zum Vorschein. Gerade bei meinen Untersuchungen über Oxydationsfermente stieß ich auf einige Beobachtungen, die meine Aufmerksamkeit auf das Gebiet der biologischen Reduktionsvorgänge lenkten und zu vorliegender Arbeit Veranlassung gaben.

Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten, von Farbstoffen zu Leukobasen usw. durch pflanzliche und tierische Gewebe setzt die Vermittelung von aktivem bzw. naszierendem Wasserstoff voraus. Da letzterer nur dem Wasser entstammen kann, so suchte ich[2]), um Aufschlüsse über diese Reduktionsprozesse zu gewinnen, die Reaktionen, bei denen Wasserspaltung unter Wasserstoffentbindung stattfindet, in Erörterung zu ziehen. Als völlig klar und eindeutig erwies sich die Reaktion, die zwischen Hypophosphiten und Wasser in Gegenwart von Palladium verläuft. Setzt man einer wässerigen Hypophosphitlösung etwas Palladiummohr zu, so wird die hypophosphorige Säure in phosphorige umgewandelt und Wasserstoff in Freiheit gesetzt. Die quantitative Untersuchung ergab, daß der Hauptsache nach die Reaktion sich nach der Gleichung $PO_2H_3 + 2HOH = PO_3H_3 + H_2O + H_2$ vollzieht. Fügt man dem Gemisch eine reduzierbare Substanz, z. B. Methylenblau, zu, so wird gleichzeitig mit

[1]) Centralbl. f. Bakt. 49, 291, 1909.
[2]) Chem. Berichte 42, 4463, 1909.

der Oxydation der hypophosphorigen Säure die Reduktion dieser Substanz bewirkt.

Es ist leicht zu ersehen, daß zwischen dieser Reaktion und der Schardingerschen eine große Analogie besteht. Noch deutlicher wird diese Analogie, wenn man in Betracht zieht, daß es Bredig und Sommer[1]) gelungen ist, in der Schardingerschen Reaktion das Milchferment durch kolloidale Metalle der Platingruppe (Iridium, Platin, Palladium) zu ersetzen. Man ist nunmehr zu der Annahme völlig berechtigt, daß der Wirkung der Systeme:

Palladium—Methylenblau—Hypophosphit—Wasser,
Palladium—Methylenblau—Aldehyd—Wasser,
Milchferment—Methylenblau—Aldehyd—Wasser

dieselbe Reaktion — die Spaltung des Wassers durch die oxydable Substanz unter Mitwirkung eines Katalysators, der mit dem Wasserstoff des Wassers eine labile, stark reduzierende Verbindung bildet — zugrunde liegt.

Nachdem hiermit das Wesen der Schardingerschen Reaktion mir als aufgeklärt erschienen war, versuchte ich, die Beziehungen des Schardinger-Enzyms zu der in den Geweben angeblich vorhandenen Redukase[2]) näher zu ermitteln. Die Leber sowie andere Organe enthalten bekanntlich ein Prinzip, das Methylenblau und andere Farbstoffe zu den entsprechenden Leukobasen reduziert und durch Kochhitze zerstört wird. Andererseits aber enthält die Leber eine oder mehrere Aldehydasen, die Aldehyde unter Wasserspaltung in die entsprechenden Alkohole und Säuren überführt. Der Gedanke lag nahe, daß zwischen der Redukase, der Aldehydase und dem Schardinger-Enzym irgend ein Zusammenhang besteht. Um Aufschlüsse über diesen Gegenstand zu gewinnen, versuchte ich, den Einfluß der Aldehyde auf die Reduktion des Methylenblaues durch Lebergewebe kennen zu lernen.

Frische Kalbsleber reduziert Methylenblau sehr energisch. Schlämmt man 2 g Leberbrei in 10 ccm Wasser auf, setzt 1 ccm Schardingersche

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 70, 34, 1909.

[2]) Ich schlage vor, die etymologisch fehlerhafte Bezeichnung „Reduktase" durch Redukase zu ersetzen. Man kann ebensowenig „Reduktase" für Redukase, wie „Oxydatase" für Oxydase sagen.

Methylenblaulösung[1]) zu und erhitzt das Gemisch im Wasserbad auf 70°, so erfolgt in kürzester Zeit die Entfärbung des Methylenblaus. Mit zum Kochen erhitzten Leberbrei bleibt die Reduktion aus. Stellt man vergleichende Versuche mit und ohne Aldehydzusatz an, so beobachtet man, daß je nach den zugesetzten Mengen der Aldehyd (Formaldehyd, Acetaldehyd) keinen oder sogar einen hemmenden Einfluß auf die Reduktion des Methylenblaus ausübt. Ich konnte aber aus der Leber Präparate darstellen, die wie das Schardinger-Enzym die Reduktion des Methylenblaus durch Acetaldehyd außerordentlich beschleunigten.

Wird Leberbrei mit dem fünffachen Gewicht 2%iger Natriumfluoridlösung gut verrieben und durch ein Tuch gepreßt, so erhält man eine Emulsion, die, mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt auf Methylenblau bei 70° gar nicht oder äußerst langsam einwirkt, in Gegenwart von Acetaldehyd (1 ccm 1%ige Lösung für 20 ccm verdünnte Emulsion) dagegen den Farbstoff in wenigen Minuten reduziert. Mit zum Kochen erhitzter Emulsion bleibt die Reduktion aus. Die filtrierte Emulsion ist völlig unwirksam, der Rückstand bleibt aktiv. Es ist mir aber gelungen, das Ferment in Lösung zu bringen und von dem Lebergewebe völlig zu trennen. Leberbrei (Kalb) wird mit dem fünffachen Gewicht 1%iger Natriumbicarbonatlösung verrieben und im Eisschrank einige Stunden stehen gelassen. Das Gemisch wird dann coliert und die Colatur wird vorsichtig mit verdünnter Essigsäure neutralisiert. Nach Filtrieren erhält man eine völlig klare, rubinrote Flüssigkeit, die das Ferment in Lösung hält. Durch Versetzen der Flüssigkeit mit dem dreifachen Volumen starkem Alkohol wird das Ferment ausgefällt. Nach Entfernung des Fällungsmittels läßt sich das Ferment aus der Fällung mit $^1/_2$%iger Natriumbicarbonatlösung extrahieren. Das vollkommen klare, farblose Filtrat, das für sich auf Methylenblau ohne Einwirkung ist, gibt nach Neutralisieren mit verdünnter Essigsäure in sehr schöner Weise die Schardingersche Reaktion. Das zum Sieden erhitzte Filtrat ist inaktiv. Das Temperaturoptimum liegt, wie bei dem Schardinger-Enzym, bei 70°. Wie das Schardinger-Enzym, ist das Ferment gegen Aldehydüberschuß sehr empfindlich. Acetaldehyd gibt bessere Resultate als Formaldehyd, wahrscheinlich wegen der größeren Giftigkeit des letzteren. Das Ferment ist sowohl in Lösung wie in festem Zustand ziemlich unbeständig. Es kann aus der Leber und anderen Organen (Lunge, Milz, Niere, Thymus) unter antispetischen Bedingungen mittels einer Lösung, die 1% Natriumbicarbonat und 2% Natriumfluorid enthält, ausgezogen werden.

Aus obigem geht mit voller Klarheit hervor, daß die Redukase der Leber und anderer Organe kein einheitliches Ferment ist, sondern aus einem Anteil, der mit dem Schardinger-

[1]) 5 ccm gesättigte alkoholische Methylenblaulösung + 95 ccm Wasser.

Enzym identisch zu sein scheint, und einem anderen, der durch Aldehyde ersetzbar ist, besteht.

Die Verhältnisse gestalten sich hier genau wie bei der gewöhnlichen Oxydase (Phenolase) und der entsprechenden Peroxydase. Bekanntlich bewirkt die Oxydase für sich dieselben Oxydationsreaktionen, wie die Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd. Auf die Wirkung normaler Oxydase übt Hydroperoxyd je nach den Konzentrationsverhältnissen keinen oder sogar einen hemmenden Einfluß aus. In veränderter Oxydase kann der unbeständige Anteil durch Hydroperoxyd ersetzt werden. Der stabile Anteil der Oxydase — die Peroxydase — kommt in gewissen Objekten, z. B. in Meerrettigwurzeln — getrennt von dem unbeständigen — vor. Nun gilt das gleiche auch für das Reduktionsferment der tierischen Organe, wenn man Redukase für Oxydase, Aldehyd für Hydroperoxyd und Schardinger-Enzym für Peroxydase setzt. Während die Oxydase als ein System Peroxydase—peroxydbildender Körper (Oxygenase) aufzufassen ist, kann die Redukase nur als ein System Ferment — wasserspaltender Körper angesehen werden. Die Analogie zwischen der Oxydase und der Redukase ist eine so auffallende und weitgehende, daß man unwillkürlich an eine Ähnlichkeit der chemischen Prozesse, die der Wirkung dieser Fermente zugrunde liegen, denkt. Zur Orientierung der weiteren Bearbeitung des Gebietes gestatte ich mir, über diesen Gegenstand folgende Ansicht kurz auszusprechen.

Die Theorie der elektrolytischen Dissoziation setzt voraus, daß Wasser, zu einem minimalen Teil in die Ionen H′ und ′OH gespalten, auftritt.

Da bei der Vierwertigkeit des Sauerstoffs Wasser auch ungesättigte Moleküle $H_2O<$ enthalten muß — der ungesättigte Zustand des Wassers ist wohl als die Grundursache der elektrolytischen Dissoziation anzusehen —, so ist es denkbar und mit den jetzt in der physikalischen Chemie zutage tretenden Anschauungen (Jones, Armstrong) völlig vereinbar, daß die H′- und ′OH-Ionen sich zum Teil mit ungesättigten Wassermolekülen zu labilen Verbindungen vereinigen. Aus den Wasserstoffionen entstehe dabei der Komplex $H_2O<'H_2$, aus den Hydroxylionen der Komplex $H_2O<('OH)_2$. Ersterer sei nichts anderes als

das hypothetische Wasserstoffsuboxyd oder Oxyperhydrid H_4O, dessen metallische Analoga M_4O wohl bekannt sind; letzteres sei das Hydroperoxydhydrat.

Betrachten wir etwas näher im Lichte dieser Annahme eine auf der Spaltung des Wassers basierende Reaktion, z. B. die von Bredig und Sommer[1]) untersuchte Reaktion zwischen Methylenblau, Formaldehyd und Wasser in Gegenwart von kolloidalem Platin. Weder für sich allein, noch vereinigt sind Methylenblau und Formaldehyd imstande, Wasser bei 70° mit meßbarer Geschwindigkeit zu spalten und sich auf Kosten desselben zu reduzieren bzw. zu oxydieren. Die Reaktion tritt aber sofort ein, wenn man dem Gemisch beider Stoffe in wässeriger Lösung kolloidales Platin zufügt. Worauf beruht der beschleunigende Einfluß des Platins? Von Engler und Wöhler[2]) ist der Beweis erbracht worden, daß der Beschleunigung von gewissen Oxydationsprozessen durch fein verteiltes Platin die Bildung von Platinperoxyd zugrunde liegt, wobei das primär entstehende Peroxyd PtO_2 sich mit Wasser zum sehr wirksamen Platinperoxydhydrat HO.Pt.OOH vereinigt. Bei der Einwirkung von Platin auf Hydroperoxyd entsteht dieselbe Verbindung, die in Anwesenheit von oxydablen Substraten dieses oxydiert, in Abwesenheit von Substraten unter Sauerstoffentwicklung zerfällt (Platinkatalyse des Hydroperoxyds). Die Beschleunigung der Oxydation des Formaldehyds im System Methylenblau—Formaldehyd—Wasser läßt sich daher in einfacher Weise erklären, wenn man annimmt, daß der labile Komplex $H_2O < ('OH)_2$ sich mit Platin zu Platinperoxydhydrat vereinigt, wodurch eine weitere Dissoziation des Wassers hervorgerufen werden muß.

Bei der Beschleunigung der Reduktion des Methylenblaus spielt wahrscheinlich das Platin eine ähnliche Rolle, wie bei der Beschleunigung der Oxydation des Methylenblaus, indem es sich mit dem Komplex $H_2O = 'H_2$ bzw. mit Wasserstoffionen und Wasser zu einem wirksamen Platinwasserstoffhydrat verbindet.

Für das Palladium ist eine derartige Verbindung bereits bekannt. Denn das von Paal und Gerum[3]) dargestellte außer-

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. anorgan. Chem. 29, 1, 1902.

[3]) Chem. Berichte 41, 805, 1908.

ordentlich wirksame, flüssige Hydrosol des Palladiumwasserstoffs ist nichts anderes als das Palladiumoxyperhydrid $PdOH_2$.

Die bekannte Eigenschaft des Platins, Palladiums usw., sich sowohl mit Wasserstoff wie mit Sauerstoff zu verbinden, setzt voraus, daß diese Metalle den Reduktionsprozeß und den Oxydationsprozeß in der Schardinger-Reaktion gleichzeitig beschleunigen: sie fungieren als Ambokatalysatoren. Dagegen wirken die in lebenden Wesen tätigen Katalysatoren spezifisch. Die auf der intermediären Bildung von labilen Sauerstoffverbindungen — Peroxyden — beruhenden Oxydationsprozesse werden durch die Peroxydase beschleunigt, die auf der Wasserspaltung und intermediärer Bildung von labilen Wasserstoffverbindungen (Perhydriden) beruhenden Reduktionsprozesse werden durch das Schardinger-Enzym beschleunigt. Die Analogie zwischen diesen Fermenten fußt auf der chemischen Ähnlichkeit der Körper, mit denen sie in Reaktion treten: bei der Peroxydase hat man es mit dem Hydroperoyd $H_2O < O$ und seinen Derivaten, bei dem Schardinger-Enzym mit dem Oxyperhydrid $H_2O < H_2$ und seinen Derivaten zu tun.

Diese Auffassung, die natürlicherweise nur als eine Orientierungshypothese angesehen werden kann, gestattet, das Gebiet der biologischen Reduktionsvorgänge in planmäßige Bearbeitung zu nehmen und ist einer weitgehenden experimentalen Prüfung zugänglich.

Zum Schlusse noch einige Worte betreffend die Nomenklatur der Reduktionsfermente. Das Milchferment, das die Reduktion von Farbstoffen in Gegenwart von Aldehyden beschleunigt, wurde von Smidt als Aldehydkatalase, von Jensen als Aldehydreduktase, von Seligmann als indirekte Reduktase, von Trommsdorff[1]) vorläufig als Schardinger-Enzym bezeichnet. Mit Rücksicht auf die im obigen erörterten Tatsachen und Analogien schlage ich vor, das Ferment mit dem Namen Perhydridase zu belegen. Die allgemeine Bezeichnung „Reduktase" ist, wie oben erwähnt, durch Redukase zu ersetzen.

Weitere Versuche über die Perhydridase sind im Gang.

---

[1]) Literatur bei Trommsdorff, Centralbl. f. Bakt. 49, 300, 1909.

Die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze.

Von

Jacques Loeb

(unter Mitwirkung von Hardolph Wasteneys).

(Aus dem Rockefeller Institut, New York.)

(Eingegangen am 7. Februar 1911.)

I. Der Entgiftungskoeffizient KCl/NaCl.

1. Das biologische Verhältnis von KCl : NaCl.

Mit der folgenden Arbeit beabsichtige ich die Versuche über antagonistische Salzwirkungen und physiologisch äquilibrierte Salzlösungen wieder aufzunehmen, die im Jahre 1902 durch meine Übersiedelung nach Californien unterbrochen wurden.

Auf die reiche Literatur dieses Gebietes möchte ich hier nicht eingehen. Statt dessen verweise ich den Leser auf die ausführliche und treffliche Behandlung, die dieselbe kürzlich durch T. B. Robertson erfahren hat.[1])

Das Problem, das meine neuen Arbeiten behandeln sollen, ist eine Feststellung der Gesetze, nach denen sich die drei, für die Physiologie so wichtigen Salze, NaCl, KCl und $CaCl_2$ im Seewasser und im Serum gegenseitig entgiften; ferner die Entscheidung darüber, ob der Antagonismus zwischen zwei Salzen zwischen den Ionen mit gleicher oder entgegengesetzter elektrischer Ladung stattfindet; und endlich die Ermittlung des Mechanismus, auf den die Entgiftung zurückzuführen ist.

Die vorliegende Mitteilung behandelt die Entgiftung von Kaliumsalzen durch Natriumsalze.

---

[1]) T. B. Robertson, Über die Verbindung der Proteine mit anorganischen Substanzen und ihre Bedeutung für die Lebensvorgänge, Ergebnisse der Physiologie 10, 1910.

Was die Entgiftung von KCl durch NaCl betrifft, so sei zunächst an die bekannten Ausführungen von **Bunge** erinnert, daß Pflanzenfresser alle Chlornatriumhunger zeigen. **Bunge** erklärt das so, daß in der Pflanzennahrung relativ viel Kaliumsalze in der Form von Carbonaten, Phosphaten oder Citraten usw., aufgenommen werden. Mit dem im Blut des Tieres enthaltenen NaCl sollen sich dann beispielsweise Natriumphosphat und Kaliumchlorid bilden, die aber beide durch die Niere ausgeschieden werden. Das bedinge eine relative Chlornatriumverarmung des Tieres und bedinge den Chlornatriumhunger der Herbivoren.

Es sei von vornherein bemerkt, daß diese Theorie von **Bunge** sich für unsere Versuche nicht verwerten läßt, weil es sich in den letzteren um giftige Dosen von KCl handelt, wodurch die Tiere einer typischen Kaliumvergiftung zum Opfer fallen. Das Kalium ist ein spezifisches Nerv- und Muskelgift, und diese Vergiftung wird in unseren Versuchen durch Zusatz von NaCl verhindert, vermutlich in der Weise, daß der Zusatz von NaCl die Geschwindigkeit des Eindringens von KCl in den Körper der Fische hindert. Nach **Bunge** sollte bei der Fütterung mit KCl ja überhaupt keine Verarmung an NaCl eintreten. Ich will aber nicht behaupten, daß die Theorie von **Bunge** für die Erklärung des Chlornatriumhungers der Herbivoren nicht zutreffe.

Während es in der Literatur nicht an Beobachtungen über teilweise Entgiftung von NaCl durch KCl fehlt, sind wenige Beobachtungen über die Entgiftung von KCl durch NaCl vorhanden. **Osterhout**[1]) stellte Versuche über die gegenseitige Entgiftung von KCl und NaCl an Weizen an, in dem er das Wachstum der Wurzeln in verschiedenen Mischungen von KCl und NaCl bestimmte. Seine Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Kulturflüssigkeit (Konzentration 0,12 M)	Totales Längenwachstum der Wurzeln einer Pflanze während 30 Tagen (Mittelwert) mm
KCl	67
30 ccm KCl, 100 „ NaCl	185,5
20 ccm KCl, 100 „ NaCl	160,4
15 ccm KCl, 100 „ NaCl	146
10 ccm KCl, 100 „ NaCl	134
5 ccm KCl, 100 „ NaCl	94,4
NaCl	55

[1]) **Osterhout**, Jahrb. f. wissenschaftl. Botan. 46, 124, 1908.

Für Versuche über die Entgiftung von KCl sind höhere Tiere besser geeignet, weil hier vermöge der spezifischen Giftwirkungen kleinerer Dosen von KCl die Gesetze für die Entgiftung dieses Salzes durch andere Salze besser zutage treten lassen.

Kalium und Natrium existieren nach van't Hoff im Seewasser in einem bestimmten molekularen Verhältnis, nämlich 2,2 Moleküle KCl auf 100 Moleküle NaCl. Ich habe nun schon früher darauf hingewiesen, daß dasselbe Verhältnis angenähert auch in dem Blutserum besteht. Hier liegt aber eine Schwierigkeit darin vor, daß Kalium in zwei spezifisch verschiedenen Arten von Verbindungen vorkommen kann, nämlich als Bestandteil komplexer organischer Radikale, aus denen es nicht als Ion dissoziierbar ist; und zweitens in der Form von Kaliumsalzen, aus denen es als Ion dissoziierbar ist. Bei der Aschenbestimmung des Serums erhält man die Summe des Kaliums in beiden Arten von Verbindungen, während für die antagonistischen, d. h. schützenden Salzwirkungen nur die eine Klasse in Betracht kommt, in der das Kalium als Ion dissoziiert werden kann. Für die Durchspülung des Froschherzens oder des Herzens der Schildkröte benutzt man $^{m}/_{8}$ NaCl-Lösungen. Will man einer solchen Lösung KCl in dem Verhältnis zusetzen, in dem es im Seewasser existiert, so daß das molekulare Verhältnis von KCl zu NaCl wie 2,2:100 ist, so muß man 0,02156 g KCl zu 100 ccm der Lösung zufügen. Die Ringersche Lösung enthält nur $^{1}/_{3}$ dieser Quantität KCl, nämlich 0,0075 g, und die Lockesche Lösung das Doppelte, nämlich 0,042 g. In einer soeben erschienenen Arbeit teilt nun Vernon[1]) mit, daß man bessere Resultate erhält, wenn man mehr KCl zufügt als Ringer und weniger als Locke. Er findet als Optimum 0,021 $^{0}/_{0}$ KCl. Das ist aber genau das Verhältnis, das man unter der Voraussetzung anwenden sollte, daß auch im Serum die K-Ionen zu den Na-Ionen im molekularen Verhältnis von 2,2:100 vorhanden sind. Ich glaube demnach schließen zu müssen, daß das Verhältnis von 2,2 Molekülen KCl zu 100 Molekülen NaCl nicht nur für Seetiere, sondern allgemein für die optimalen Durchspülungsflüssigkeiten gilt, und daß es sich hier um eine biologische Konstante handelt.

Die Versuche, die hier mitgeteilt werden, sind an einem marinen Fisch, Fundulus, angestellt, dessen Eier zu meinen früheren Versuchen gedient hatten. Diese Fische bieten den Vorteil, daß sie innerhalb der für unsere Zwecke erforderlichen Konzentrationsgrenzen vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig sind. Das erlaubt uns, bei Konstanthaltung der Konzentration des toxischen Salzes die des entgiftenden Salzes beliebig zu variieren, ohne daß es nötig ist, noch einen dritten Stoff zur Konstanthaltung des osmotischen Druckes zuzufügen.

Ehe die Fische in die zum Versuche dienenden Lösungen gebracht wurden, wurden sie zweimal in Süßwasser und dann

---

[1]) Vernon, Journ. of Physiol. 40, 295, 1910.

noch einmal in destilliertem Wasser gewaschen und so von allen Spuren Seewasser befreit. Je 6 Fische wurden stets in 500 ccm einer Lösung gebracht, und es wurde dann jeden Tag die Zahl der überlebenden Fische festgestellt.

Man hat als störende Variable in diesen Versuchen den Umstand zu berücksichtigen, daß gelegentlich einzelne Fische kränklich sind (Infektion durch Saprolegnia usw.) und daß daher in Fällen, in denen 6 Fische überleben sollten, gelegentlich nur 4 Fische oder nur 3 Fische überlebten. Solche zufällige Störungen konnten durch Wiederholung der Versuche ausgeglichen werden. Im allgemeinen sind die Resultate so scharf, daß man ohne weiteres diese zufälligen Störungen als solche erkennt. Was die Versuchsdauer betrifft, so war dieselbe gewöhnlich 2 bis 4 Wochen. Nach 2 Wochen macht sich gelegentlich, namentlich bei höher konzentrierten Lösungen, der Effekt der Verdunstung bemerkbar. Man erhält meist schon nach 1 bis 2 Wochen klare Resultate.

Es war unmöglich, bei den zahlreichen Versuchen, die wir anstellen mußten, die Temperaturen konstant zu halten. Das bedingt z. B. die kleinen Schwankungen, die der Leser in der Lebensdauer der Fische in derselben Lösung, aber in verschiedenen Versuchen bemerken wird. Die Temperatur stieg gelegentlich auf 20° C oder darüber, fiel in anderen Fällen auf 10°. Die Konzentrationsgrenzen für die Entgiftung sind aber anscheinend gar nicht oder nur unbedeutend hierdurch beeinflußt worden. Um sicher zu gehen, vergleichen wir immer nur solche Versuchsreihen untereinander, die gleichzeitig angestellt waren. In solchen Versuchen ist das Material und die Temperaturvariation identisch.

Während der Versuchsdauer wurden die Fische nicht gefüttert.

Das destillierte Wasser wurde im Laboratorium mit allen Kautelen in Glas hergestellt und auf das sorgfältigste auf seine Reaktion geprüft.

2. Die relative Giftigkeit der einzelnen Bestandteile des Seewassers.

Soviel ich weiß, hat noch niemand die relative Giftigkeit der einzelnen Bestandteile des Seewassers für Seetiere unter-

sucht. Eine solche Untersuchung läßt sich nämlich nur an solchen Seetieren durchführen, die, wie Fundulus, vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig sind. Das Seewasser ist nach van't Hoff ein Gemisch von folgender molekularer Zusammensetzung: 100 Moleküle NaCl, 2,2 KCl, 1 bis 2 $CaCl_2$, 7,8 $MgCl_2$, 3,8 $MgSO_4$. Von den Phosphaten und Carbonaten sehen wir zunächst ab. Meine Versuche in Californien und neuerdings in Woods Hole haben ergeben, daß wir die optimale Konzentration für eine künstliche Lösung für Seetiere erhalten, wenn wir die Salzlösungen alle in halbmolekularer Konzentration anwenden.

Ich stellte nun folgende 5 Lösungen her:

1. 100 ccm $^m/_2$ NaCl,
2. 2,2 „ „ KCl + 97,8 destilliertes Wasser,
3. 2,0 „ „ $CaCl_2$ + 98 „ „
4. 7,8 „ „ $MgCl_2$ + 92,2 „ „
5. 7,8 „ „ „ + 3,8 ccm $^m/_2$ $MgSO_4$ + 88,4 ccm dest. Wasser.

In jede der Lösungen wurden 6 Fundulus gebracht. In Lösung 3, 4 und 5 lebten die Fische beliebig lange, d. h. mehr als 4 Wochen — dann wurden die Versuche unterbrochen. In Lösung 1 und 2 starben die Fische in wenigen Tagen, in der Kaliumchloridlösung rascher als in der Chlornatriumlösung. Die niedrige Konzentration der KCl-Lösung war nicht für das Resultat verantwortlich, denn in einer NaCl-Lösung von demselbem osmotischen Drucke — z. B. $^m/_{100}$ NaCl — leben die Fische beliebig lange, desgleichen in einer $^m/_{100}$ $CaCl_2$ oder $^m/_{100}$ $MgCl_2$-Lösung.

Dieses Resultat ist von Interesse, weil es zeigt, daß die im Seewasser enthaltenen Chloride mit einwertigem Metall in der Konzentration, in der sie im Seewasser enthalten sind, giftig sind,[1]) während die mit zweiwertigem Metall ungiftig sind. Ob das gleiche auch für $MgSO_4$ gilt, habe ich noch nicht untersucht.

[1]) Diese Tatsache war für NaCl schon vor 10 Jahren gefunden worden. KCl ist spezifisch giftig für Organismen mit Nerven und Muskeln. Für den ersten Tag der Entwicklung des Fundulusembryo ist KCl kaum giftiger als NaCl, es wird aber giftiger, sobald die Herztätigkeit und die Zirkulation im Embryo eintreten. Das habe ich in meinen früheren Arbeiten diskutiert.

3. Die untere Konzentration für die Giftigkeit von KCl.

Es war eine Überraschung für mich, zu finden, daß das KCl in der Konzentration, in der es im Seewasser vorhanden ist (2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung) ein rasch tödliches Gift für Fundulus ist. Diese Giftwirkung bleibt uns gewöhnlich verborgen, weil die anderen Bestandteile des Seewassers diese giftige Wirkung aufheben. Was für Fundulus gilt, dürfte wohl auch für viele, wenn nicht alle anderen Seetiere zutreffen. Wir können das aber leider nicht prüfen, weil nur wenige Seetiere vom osmotischen Druck der umgebenden Lösung genügend unabhängig sind, um die Versuche anzustellen, die wir eben für Fundulus erwähnt haben.

Es wurden nun Versuche angestellt, um die untere Grenze für die Giftigkeit einer KCl-Lösung zu ermitteln. Der folgende Versuch deutet die Zunahme der Giftigkeit mit der Konzentration an. Je 6 Fische wurden in jede Lösung gebracht und die Zahl der überlebenden Fische in jeder Lösung täglich festgestellt.

Tabelle I.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in				
	0,25	0,55	1,1	2,2	3,3
	ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung				
1	6	6	5	3	2
2	6	6	5	3	0
3	6	6	1	2	
4	6	6	0	0	
5	6	6			
6	6	6			
7	6	6			
8	6	6			
9	6	6			
10	6	6			

Es war für die Zwecke dieser Untersuchung nötig, auch andere Kaliumsalze neben KCl in Betracht zu ziehen; es wurden K_2SO_4 und essigsaures Kalium gewählt. Nach Overton sollen diese Salze für den Froschmuskel ungiftig sein. Ehe Overton die Muskeln in die Lösungen dieser Salze brachte, befreite er sie erst von dem an der Oberfläche etwa haftenden NaCl, in dem er sie 6 Stunden in eine Zuckerlösung brachte. Ich wusch die Fische, die in die Lösungen von K_2SO_4 gebracht

wurden, erst 4 Stunden in Süßwasser, das 2mal gewechselt wurde, und dann 2 Stunden in einer $^m/_{100}$ Na_2SO_4-Lösung (Kahlbaums „Zur Analyse"). Es stellte sich heraus, daß eine Lösung von K_2SO_4 2mal so giftig ist wie eine äquimolekulare Lösung von KCl. Die Tabelle II mag als Beispiel dienen.

Tabelle II.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,25 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 in 100 ccm der Lös. in H_2O	0,55	1,1	1,65
1	6	4	4	2
2	6	0	0	0
3	5			
4	5			
5	5			
6	5			
7	5			
8	4			
9	4			
10	4			

Eine Lösung von 0,25 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 ist ebenso wirksam wie die von 0,55 ccm $^m/_2$ KCl in der Tabelle I. Was die Wirkung von essigsaurem Kalium anbetrifft, so ist seine Giftigkeit von derselben Größenordnung oder etwas größer als die einer äquimolekularen Lösung von KCl. Die Tabelle III kann als Beispiel gelten. Die Fische waren 4 Stunden in Süßwasser, dann 2 Stunden in $^m/_{100}$ Na-Acetat gewaschen worden, ehe sie in die Lösungen von KCl gebracht wurden.

Tabelle III.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,25 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium in 100 ccm der Lösung in H_2O	0,55	1,1	2,2	3,3
1	6	6	6	3	3
2	5	3	0	0	0
3	5	3			
4	5	3			
5	5	3			
6	5	3			
7	5	3			
8	5	3			
9	5	3			
10	5	3			

Im allgemeinen wurden die Lösungen mit essigsaurem Kalium rasch trübe, eine Erscheinung, die bei allen Lösungen

mit organischen Stoffen beobachtet wurde. Vermutlich waren Bakterien oder sonstige Nebenbedingungen hier von Einfluß.

Es ist auch noch nötig, zu erwähnen, daß die Versuche der Tabellen I, II und III gleichzeitig angestellt wurden, so daß die Temperaturverhältnisse für diese 3 Versuche identisch waren.

4. Die Giftigkeit von Lösungen von verschiedenen Natriumsalzen.

Im Jahre 1899 machte ich darauf aufmerksam, daß das im Seewasser und im Serum enthaltene K und Ca nicht direkt für die Tiere nötig sei, sondern nur zur Entgiftung des NaCl diene, das in höheren Konzentrationen giftig sei. Diese Tatsache wird auch bei den Versuchen an den halb ausgewachsenen Fundulus wieder bemerkbar. Da in den Versuchen dieser Arbeit NaCl zur Entgiftung benutzt wird, war es nötig, die Grenzen der Giftigkeit von reinen NaCl-Lösungen für diese Fische genauer kennen zu lernen.

Tabelle IV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in				
	$^m/_{100}$	$^m/_{20}$	$^m/_8$	$^m/_4$	$^m/_2$ NaCl
2	6	6	6	6	3
3	6	6	6	3	0
4	6	6	6	2	
5	6	6	6	2	
6	6	6	6	2	
7	6	6	6	2	
10	6	5	6	1	
15	5	5	6	1	

Das ist ein Beispiel eines günstigen Versuches. Im allgemeinen starben die Fische in Lösungen, die konzentrierter waren als $^m/_4$ in kurzer Zeit, während sie in Lösungen von $^m/_8$ und darunter beliebig lange am Leben blieben. Der Zusatz von Ca und K zur NaCl-Lösung wird bei Fundulus erst nötig, wenn die NaCl-Lösung eine höhere Konzentration besitzt als $^m/_8$, also höher ist als ein Viertel der normalen Konzentration.

Die Lösungen von Na_2SO_4 sind viel giftiger als die Lösungen von NaCl. Eine $^m/_8$ Na_2SO_4-Lösung ist giftiger als eine $^m/_4$ NaCl-Lösung. In einer $^m/_{16}$ Lösung von Na_2SO_4 konnten die Fische etwa 10 Tage leben, also nicht so lange wie in einer $^m/_8$ Lösung von NaCl. Das rührt wohl daher, daß eine so konzentrierte

Lösung von Na_2SO_4 das Ca an der Oberfläche des Tieres zum Teil fällen muß.

Eine $^m/_{16}$ Lösung von Na_2SO_4 ist wenigstens so weit ungiftig, daß sie als entgiftende Lösung benutzt werden kann. $^m/_{50}$ und $^m/_{100}$ Lösungen von Na_2SO_4 waren praktisch harmlos für die Fische, die in solchen Lösungen lange leben konnten.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß die bei diesen Versuchen gebrauchten Salze die reinsten Kahlbaumschen Präparate, im Falle von NaCl und Na_2SO_4 die mit der Marke „Zur Analyse" versehenen Salze waren.

5. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten von KCl durch NaCl für mittlere Konzentration von KCl.

Ich fand sehr bald, daß eine NaCl-Lösung imstande ist, eine Lösung von KCl zu entgiften, und daß sich die Grenzkonzentration des NaCl, bei der diese Entgiftung eintritt, scharf bestimmen läßt. Als Beispiel diene einer meiner ersten Versuche in dieser Richtung. 2,2 ccm $^m/_2$ KCl waren in je 100 ccm der folgenden Lösungen von NaCl gelöst: $^m/_{100}$, $^m/_{20}$, $^m/_8$, $^m/_4$, $^{3m}/_8$, $^m/_2$. In jede Lösung wurden je 6 Fundulus gebracht und jeden Tag die Zahl der überlebenden Fische festgestellt.

Tabelle V.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm						
	H_2O	$^m/_{100}$	$^m/_{20}$	$^m/_8$	$^m/_4$	$^{3m}/_8$	$^m/_2$ NaCl
1	2	1	3	4	6	6	6
2	0	0	0	0	6	5	6
3					6	4	6
4					5	3	5
5					5	3	4
6					5	3	1
7					5	3	0
14					4	3	

Man sieht, daß eine $^m/_8$ Lösung von NaCl noch völlig außerstande ist, die KCl-Lösung zu entgiften, während die Entgiftung in der $^m/_4$ Lösung vollständig ist.

Es wurde bei der Wiederholung desselben Versuches mit 2,2 ccm $^m/_2$ KCl gefunden, daß die entgiftende Konzentration des NaCl wie in diesem Versuche zwischen $^m/_8$ und $^m/_4$ liegt. Das führte naturgemäß zur Frage, ob die zur Entgiftung nötige

Konzentration des NaCl sich mit der Konzentration des KCl ändert. Die folgenden 3 Versuchsreihen mit 1,1 und 2,2 und 4,4 ccm KCl in 100 ccm der Lösung wurden gleichzeitig zum Vergleich angestellt.

Tabelle VI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm						
	$^m/_{100}$	$^m/_{16}$	$^m/_8$	$^{3m}/_{16}$	$^m/_4$	$^{3m}/_8$	$^m/_2$ NaCl
1	5	6	6	5	6	6	6
2	3	4	6	5	6	6	5
3	0	2	6	4	6	5	4
4		1	6	4	5	5	4
5		0	6	4	5	5	4
6			4	3	5	4	4
7			4	3	5	3	4
8			4	3	5	3	4
9			4	3	5	3	4
16			4	3	5	2	0

Tabelle VII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm						
	$^m/_{100}$	$^m/_{16}$	$^m/_8$	$^{3m}/_{16}$	$^m/_4$	$^{3m}/_8$	$^m/_2$ NaCl
1	4	6	6	6	6	6	6
2	1	1	3	6	6	6	4
3	0	0	0	5	6	5	4
4				2	5	5	2
5				1	4	4	2
6				1	4	4	2
7				1	4	4	1
14				1	4	2	1
21				0	4	1	1

Tabelle VIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 4,4 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^m/_{16}$	$^m/_8$	$^{3m}/_{16}$	$^m/_4$	$^{3m}/_8$	$^m/_2$ NaCl
1	5	5	2	5	7	6
2	0	0	0	2	7	1
3				0	5	1
4					4	1
5					3	1
6					3	1
7					3	1
8					1	1
9					1	1
10					1	1
11					0	1

Vergleicht man diese 3 Tabellen, so fallen die folgenden Tatsachen auf, erstens, daß die Grenzkonzentration, bei der die entgiftende Wirkung des NaCl auftritt, eine scharfe ist, und daß diese Konzentration anscheinend direkt proportional der Konzentration des KCl ist, nämlich für

1,1 ccm KCl zwischen $^m/_{16}$ und $^m/_8$ NaCl.
2,2 „ „ bei $^3/_{16}$ m NaCl,
4,4 „ „ „ $^3/_8$ „ „

liegt. Spätere Versuche zeigten, daß die entgiftende Wirkung von 1,1 ccm KCl gewöhnlich eintritt, wenn C_{NaCl} ungefähr $^{3\,m}/_{32}$ ist. Ein dritter Umstand, der zu beachten ist, ist die Tatsache, daß bei 4,4 KCl die Entgiftung nicht mehr so vollständig ist wie bei 2,2 oder 1,1 KCl; d. h. die Zahl der überlebenden Tiere ist bei 4,4 KCl auch bei maximaler Entgiftung kleiner als bei 2,2 KCl.

Wir wollen nun, ehe wir weiter gehen, einen neuen Begriff einführen, der für das Gebiet der antagonistischen Salzwirkungen wichtig ist, nämlich den des Entgiftungskoeffizienten. Darunter verstehen wir den Wert des Verhältnisses der Konzentration des giftigen zu der des entgiftenden Salzes, die zur Entgiftung gerade ausreicht. Die wesentliche Aufgabe war nun, diesen Koeffizienten für KCl und NaCl genauer zu bestimmen, als das in den vorhin erwähnten Versuchen geschah. Zu dem Zweck wurden Versuche angestellt, in denen das Konzentrationsintervall von NaCl $^m/_{32}$ war. Es wurde der Entgiftungskoeffizient für 5 verschiedene Konzentrationen von KCl bestimmt. Die Tabellen sollen in extenso mitgeteilt werden.

Tabelle IX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm			
	$^2/_{32}$	$^3/_{32}$	$^4/_{32}$	$^5/_{32}$ m NaCl
2	5	6	6	6
3	1	6	6	6
4	0	6	6	6
5		1	6	6
6		0	6	6
7			6	6
8			6	4
9			6	4
14			6	4

Die Lösungen, die in diesen Abhandlungen erwähnt sind, waren stets so gewählt, daß die betreffende Menge des giftigen Salzes in 100 ccm der Lösung enthalten war. 2,2 ccm $^{m}/_{2}$ KCl waren also beispielsweise stets in 100 ccm der entgiftenden Lösung enthalten.

Tabelle X.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^{m}/_{2}$ KCl pro 100 ccm				
	$^{3}/_{32}$	$^{4}/_{32}$	$^{5}/_{32}$	$^{6}/_{32}$	$^{7}/_{32}$ m NaCl
2	4	5	6	7	7
3	0	0	6	7	7
4			2	7	7
5			2	7	7
6			1	7	7
7			1	7	7
8			1	7	7
9			0	6	7
14				2	3

Tabelle XI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^{m}/_{2}$ KCl pro 100 ccm				
	$^{5}/_{32}$	$^{6}/_{32}$	$^{7}/_{32}$	$^{8}/_{32}$	$^{9}/_{32}$ m NaCl
2	6	6	6	6	6
3	0	5	6	5	6
4		4	6	5	6
5		3	6	5	6
6		2	5	5	6
7		2	5	5	6
8		2	5	5	6
9		1	4	4	6
14		1	0	2	3

Tabelle XII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,75 ccm $^{m}/_{2}$ KCl in 100 ccm				
	$^{6}/_{32}$	$^{7}/_{32}$	$^{8}/_{32}$	$^{9}/_{32}$	$^{10}/_{32}$ m NaCl
2	4	6	6	6	6
3	0	5	6	6	6
4		2	4	6	6
5		2	4	5	5
6		2	4	5	4
7		2	4	5	4
8		2	4	5	4
9		2	3	5	3
14		2	0	1	1

Tabelle XIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm					
	$^7/_{32}$	$^8/_{32}$	$^9/_{32}$	$^{10}/_{32}$	$^{11}/_{32}$	$^{12}/_{32}$ m NaCl
2	6	6	6	6	6	7
3	1	4	5	4	5	7
4	0	1	5	2	5	7
5		0	2	2	5	7
6			2	2	4	6
7			2	2	4	5
8			2	1	4	5
9			2	1	4	5
14			0	1	2	5

Bestimmen wir nun den Entgiftungskoeffizienten für KCl durch NaCl, so haben wir in diesen Versuchen folgende Daten.

Tabelle XIV.

	Entgiftungs-Koeffizient C_{KCl}/C_{NaCl}
1,1 ccm $^m/_2$ KCl entgiftet durch 100 ccm $^3/_{32}$ m NaCl[1])	$^1/_{17}$—$^1/_{20}$
1,65 „ „ „ „ „ 100 „ $^5/_{32}$ „ „	$^1/_{19}$
2,2 „ „ „ „ „ 100 „ $^6/_{32}$ „ „	$^1/_{17}$
2,75 „ „ „ „ „ 100 „ $^7/_{32}$ „ „	$^1/_{16}$
3,5 „ „ „ „ „ 100 „ $^9/_{32}$ „ „	$^1/_{17}$

Der Entgiftungskoeffizient C_{KCl}/C_{NaCl} ist also praktisch konstant, und zwar im Durchschnitt $^1/_{17}$. Die Einzelwerte schwanken nur wenig um diesen Wert. Diese Schwankungen könnten dadurch bedingt sein, daß die Konzentrationsintervalle für NaCl nicht klein genug gewählt waren, oder daß sie in den Grenzen der Genauigkeit dieser Versuche liegen. Es wurde eine Versuchsreihe mit 1,1 ccm $^m/_2$ KCl und 1,65 ccm $^m/_2$ KCl angestellt, in denen das Konzentrationsintervall der entgiftenden NaCl-Lösung $^m/_{100}$ resp. $^m/_{50}$ betrug. Das Resultat ist in den Tabellen XV und XVI wiedergegeben.

Der Entgiftungskoeffizient ist $^1/_{18}$ resp. $^1/_{19}$. In einem analogen Versuch bestimmte ich den Entgiftungskoeffizienten für 2,2 ccm und 2,75 ccm $^m/_2$ KCl, ebenfalls für Intervalle von $^m/_{100}$ von NaCl. Der Entgiftungskoeffizient für 2,2 ccm KCl betrug $^1/_{18}$, der für 2,75 ccm $^1/_{16}$. Wir kommen also zu dem Schluß, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl

[1]) Der wirkliche Wert liegt ein wenig über $^3/_{32}$ m.

durch NaCl praktisch konstant ist und nur wenig vom Werte $^1/_{17}$ abweicht, solange die Konzentration von KCl zwischen 1,1 und 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung beträgt.

Tabelle XV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm											
	$^m/_{100}$	$^{2m}/_{100}$	$^{3m}/_{100}$	$^{4m}/_{100}$	$^{5m}/_{100}$	$^{6m}/_{100}$	$^{7m}/_{100}$	$^{8m}/_{100}$	$^{9m}/_{100}$	$^{10m}/_{100}$	$^{11m}/_{100}$	$^{12m}/_{100}$
2	1	1	2	1	1	3	3	5	5	6	6	6
3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	6	6
4								0	1	5	5	5
5										5	5	5
6										5	5	5
7										5	5	5
10										5	5	5

Tabelle XVI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm								
	$^m/_{100}$	$^{2m}/_{100}$	$^{4m}/_{100}$	$^{6m}/_{100}$	$^{8m}/_{100}$	$^{10m}/_{100}$	$^{12m}/_{100}$	$^{14m}/_{100}$	$^{16m}/_{100}$
2	2	1	1	0	1	4	5	5	6
3	0	0	0	0	0	0	1	3	5
4							0	0	5
5									4
6									2
7									2
10									2

Da im Seewasser und anscheinend auch in der optimalen Durchspülungsflüssigkeit für das Herz das Konzentrationsverhältnis $KCl : NaCl = \frac{2,2}{100}$, also angenähert $= {}^1/_{45}$ ist, so sieht man, daß für eine vollständige Entgiftung hier gesorgt ist, auch wenn man von der entgiftenden Wirkung des Ca absieht.

6. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten für niedrigere Konzentrationen von KCl.

Die Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten von KCl durch NaCl für niedrige Konzentrationen von KCl bietet eine Schwierigkeit, die dadurch bedingt ist, daß in solchen Konzentrationen das KCl wenig giftig ist. Gleichwohl kommt man zum Ziele. Eine Reihe von Tabellen wird das klar machen.

Tabelle XVII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,6 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	3	5	6	5	6	6	6
3	2	2	4	5	5	6	6
4	2	2	2	5	5	6	6
5	2	2	2	5	5	5	6
6	2	2	2	5	5	5	6
7	2	1	2	4	5	5	6
8	2	1	2	4	5	5	6
9	2	1	2	4	5	5	6

In der $^m/_{64}$ und $^m/_{32}$ Lösung von NaCl sind die Resultate nicht besser als in der Lösung von 0,6 ccm $^m/_2$ KCl in destilliertem Wasser. In der $^3/_{64}$ m Lösung von NaCl und in den höheren Konzentrationen von NaCl aber tritt das normale Verhalten der Fische ein, das für die durch NaCl völlig oder nahezu entgiftete Lösung von KCl charakteristisch ist. Wir dürfen also sagen, daß die volle Entgiftung einer Lösung von 0,6 ccm KCl durch NaCl bei $^3/_{64}$ m NaCl liegt.

Zur Bestätigung des Gesagten soll die Tabelle XVIII dienen, in der 0,7 ccm KCl zur Vergiftung benützt wurden. Der Versuch war mit dem vorigen gleichzeitig — also mit dem gleichen Material und bei der gleichen Temperatur — angestellt.

Tabelle XVIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	6	5	5	6	6	6	6
3	4	1	2	4	6	6	6
4	3	0	1	2	5	6	6
5	3		1	1	4	6	6
6	3		1	1	4	6	6
7	2		1	1	4	6	6
8	2		1	1	4	6	6
9	2		1	1	4	6	6

In diesem Falle läßt sich mit völliger Sicherheit behaupten, daß 0,7 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm einer $^1/_{64}$ bis $^3/_{64}$ m Lösung von NaCl giftiger, resp. mindestens ebenso giftig ist wie in 100 ccm destilliertem Wasser, daß aber in Lösungen von $^4/_{64}$ m oder mehr NaCl, Entgiftung eintritt.

Nach dem Gesagten sind die folgenden Tabellen, die Versuche mit 0,9 und 1,0 ccm m/2 KCl pro 100 ccm der Lösung wiedergeben, ohne weiteres verständlich. Die Versuche sind gleichzeitig mit denen in Tabelle XVII und XVIII angestellt.

Tabelle XIX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,9 ccm m/2 KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	1/64	2/64	3/64	4/64	5/64	6/64 m NaCl
2	3	4	2	6	5	6	6
3	2	0	2	3	3	6	6
4	2		1	1	3	5	5
5	2		1	1	2	5	4
6	1		1	1	2	5	4
7	1		1	1	2	5	4
8	0		1	1	2	5	4
9			1	1	2	5	3

Tabelle XX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,0 ccm m/2 KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	H_2O	1/64	2/64	3/64	4/64	5/64	6/64 m NaCl
2	3	3	3	3	6	6	6
3	3	0	0	2	4	3	6
4	1	0	0	0	0	2	6
5	0					1	5
6						1	5
7						1	5
8						1	5
9						1	5

Während die zur Entgiftung von 0,9 m/2 KCl nötige Konzentration von NaCl 5/64 m ist, liegt sie für 1,0 KCl etwas unter, aber nahe bei 6/64 m NaCl. Für 1,1 m KCl lag sie in diesem Versuche etwas über 6/64 m NaCl. Wir erhalten also nach dieser Versuchsreihe die folgenden Entgiftungskoeffizienten.

Tabelle XXI.

		Entgiftungskoeffizient
0,6 ccm m/2 KCl entgiftet in 100 ccm	3/64 m NaCl	1/16
0,7 „ „ „ „ „ 100 „	4/64 „ „	1/18
0,9 „ „ „ „ „ 100 „	5/64 „ „	1/17
1,0 „ „ „ „ „ 100 „	5/64—6/64 „ „	1/16—1/19
1,1 „ „ „ „ „ 100 „	6/64 „ „	1/17

Man sieht also, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl durch NaCl auch für niedrige Konzentrationen von KCl angenähert $^1/_{17}$ beträgt, also konstant bleibt. Nebenbei soll hier ein Resultat vorläufig mitgeteilt werden, auf das wir in einer späteren Abhandlung zurückkommen werden, nämlich daß sehr niedrige Konzentrationen von NaCl nicht nur nicht entgiftend, sondern im Gegenteil sensibilisierend für die Giftigkeit des Kaliums wirken. Die Tabellen XVIII bis XX zeigen das sehr deutlich.

7. Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten für KCl-Lösungen von höheren Konzentrationen.

Die bisherigen Versuche erstreckten sich auf Konzentrationen von 0,6 bis 3,3 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung. Lassen sich auch KCl-Lösungen von höherer Konzentration durch NaCl entgiften und bleibt der Entgiftungskoeffizient konstant? Der Grund, daß diese Frage gesondert behandelt wird, liegt darin, daß für höhere Konzentrationen von KCl die Entgiftung unvollständig ist, d. h. daß nicht alle Tiere oder die Mehrzahl derselben, sondern meist nur ein bis zwei Tiere lange überleben.

In Vorversuchen wurde festgestellt, wieviel KCl überhaupt durch NaCl entgiftet werden kann. Es stellte sich heraus, daß die oberste Grenze etwa bei 6,6 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung liegt. Auf diesen Grenzwert komme ich in einer späteren Arbeit zurück.

Nimmt man die Intervalle von NaCl größer als $^m/_{32}$, so findet man ungefähr dieselben Entgiftungskoeffizienten wie bei den niedrigeren Konzentrationen. In einem Versuche wurden folgende Resultate gefunden:

2,2 ccm $^m/_2$ Kaliumacetat wurden entgiftet in 100 ccm $^3/_{16}$ m NaCl
4,4 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^3/_8$ „ „
6,6 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^m/_2$—$^5/_8$ „

In diesem Versuche waren die Grenzkonzentrationen etwas schärfer, als das sonst bei diesen hohen Konzentrationen von KCl der Fall ist.

Zur Bestimmung des Entgiftungskoeffizienten wurden nun Versuchsreihen mit kleineren Konzentrationsintervallen anstellt. Um das Tabellenmaterial in dieser Abhandlung nicht

allzusehr zu häufen, seien nur die Resultate mitgeteilt. In einer Versuchsreihe wurde die Entgiftungskonzentration von NaCl für 4,4, 4,95 und 5,5 $^m/_8$ KCl in 100 ccm der Lösung festgestellt. Das Konzentrationsintervall für NaCl betrug $^m/_{32}$. Die folgende Tabelle gibt das Resultat.

Tabelle XXII.

	Entgiftungs-koeffizient
4,4 ccm $^m/_8$ KCl entgiftet in 100 ccm $^{11}/_{32}$ m NaCl	$^1/_{16}$
4,95 „ „ „ „ „ 100 „ $^{12}/_{32}$ „ „	$^1/_{15}$
5,5 „ „ „ „ „ 100 „ $^{13}/_{32}$ „ „	$^1/_{15}$

In einem zweiten Versuche war das Intervall der Konzentration des NaCl ebenfalls $^m/_{32}$.

Tabelle XXIII.

	Entgiftungs-koeffizient
3,3 ccm $^m/_8$ KCl wurden entgiftet durch 100 ccm $^9/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$
4,4 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^{11}/_{32}$ „ „	$^1/_{16}$
5,5 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^{13}/_{32}$ „ „	$^1/_{16}$

Es scheint also, daß der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$ für 4,4 ccm bis 5,5 ccm $^m/_8$ KCl in 100 ccm der Lösung $^1/_{16}$ bis $^1/_{15}$ ist. Es findet also, wenn überhaupt, nur eine geringe Zunahme des Wertes des Koeffizienten an der oberen Grenze statt.

8. Versuche mit nicht gemeinsamem Anion.

In allen bisher erwähnten Versuchen hatten das giftige und entgiftende Salz ein gemeinsames Anion. Es wurde festgestellt, daß hierdurch der Entgiftungskoeffizient nicht beeinflußt wird. Die folgenden Versuche sollen als Beispiel dienen.

0,5 ccm $^m/_8$ K_2SO_4 wurden entgiftet in 100 ccm $^m/_8$ NaCl
1,1 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^m/_4$ „
2,2 „ „ „ „ „ „ 100 „ $^3/_8$ „

Berücksichtigt man, daß für die Giftwirkung die K-Ionen und nicht die K_2SO_4-Moleküle in Betracht kommen, so sieht man, daß die Werte für den Entgiftungskoeffizienten identisch sind mit dem für KCl gefundenen.

Ferner sei das Resultat einer Versuchsreihe mit essigsaurem Kalium als giftiger und NaCl als entgiftender Lösung angeführt (Konzentrations-Intervallen von NaCl $^m/_{32}$).

Tabelle XXIV.

		Entgiftungs-koeffizient
1,1 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet	in 100 ccm $^3/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$
1,65 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet	in 100 ccm $^5/_{32}$ m NaCl	$^1/_{19}$
2,2 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet	in 100 ccm $^6/_{32}$—$^7/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$—$^1/_{20}$
3,3 ccm $^m/_2$ essigsaures Kalium wurden entgiftet	in 100 ccm $^9/_{32}$ m NaCl	$^1/_{17}$

Das gemeinsame Anion in den Versuchen mit KCl beeinflußte also den Wert des Entgiftungskoeffizienten nicht wesentlich.

II. Wird K durch das gleichsinnige oder das entgegengesetzt geladene Ion des antagonistischen Salzes entgiftet?

Die Tatsache, daß der Entgiftungskoeffizient von KCl durch Natriumsalze nahezu konstant ist, erinnert an das Verteilungsgesetz, und es liegt nahe anzunehmen, daß es sich bei der Entgiftung von KCl durch Natriumsalze im Grunde darum handelt, daß sich die beiden Metalle K und Na auf ein gemeinsames, an der Oberfläche des Fisches enthaltenes Anion verteilen. Diese Annahme steht im Einklang mit der von mir vor 12 Jahren ausgesprochenen Hypothese, daß die Bedeutung der drei Metalle Na, K und Ca für die Erhaltung des Lebens darin liegt, daß dieselben mit demselben Bestandteil — vermutlich einem Eiweißkörper — eine Verbindung bilden,[1]) aus der sie sich gegenseitig nach dem Massenwirkungsgesetz verdrängen können. Nur dann sei der Ablauf des Lebens in der Zelle möglich, wenn die drei Metalle sich mit dem gemeinsamen, vermutlich kolloidalen Anion des lebenden Organismus in dem Verhältnis verbinden, wie es das Massenwirkungsgesetz und die relative Konzentration der drei Ionen im Seewasser resp. Serum bedingen.

Alle diese Annahmen aber verlangen den Nachweis, daß bei der Entgiftung von KCl durch NaCl der Antagonismus zwischen den gleichsinnig geladenen Ionen K und Na und nicht zwischen den entgegengesetzt geladenen Ionen K und Cl

[1]) Der Gedanke, daß Ionen sich mit Eiweißkörper verbinden, war unabhängig von mir auch von Wolfgang Pauli ausgesprochen worden.

besteht. Dieser Nachweis ist noch nicht erbracht. Wenn eine $^5/_8$ m Lösung von NaCl durch eine 2000mal geringere Konzentration von $CaCl_2$ entgiftet wird, so besteht kaum ein Zweifel, daß Ca das entgiftende Ion ist. Ob aber Na oder Cl das giftige Ion ist, ist nicht klar. Tatsächlich vertreten A. P. Mathews und W. Koch[1]) und vielleicht auch andere heute noch die Ansicht, daß in diesen und ähnlichen Fällen der Antagonismus immer zwischen den entgegengesetzt geladenen Ionen besteht, daß also, wenn Na das entgiftende, Cl das giftige Ion ist.

Es schien mir nun, daß es möglich sei, eine Entscheidung zwischen den hier bestehenden Möglichkeiten herbeizuführen. Wir wissen, daß die giftige Wirkung der Kaliumsalze in diesen Versuchen vom Kaliumion und nicht vom Anion Cl ausgeht, da die Fische in den Lösungen von NaCl, $CaCl_2$ oder $MgCl_2$ von der Konzentration, in der das KCl allein tödlich ist, beliebig lange leben. Es ist nur zweifelhaft, ob die entgiftende Wirkung des NaCl vom Na-Ion oder vom Cl-Ion ausgeht. Der Umstand, daß der Entgiftungskoeffizient KCl/NaCl nahezu eine Konstante ist, erlaubt die Frage zu beantworten, wenn wir als entgiftendes Salz ein Salz mit zweiwertigem Anion, z. B. Na_2SO_4, anwenden. Wird das K-Ion durch das Na-Ion entgiftet, so muß eine genau halb so große Konzentration von Na_2SO_4 zur Entgiftung von KCl ausreichen, wie sie im Falle von NaCl nötig ist.

Geht dagegen die antagonistische Wirkung vom Anion aus, so ist zu erwarten, daß die Hardy-Whethamsche Regel zutrifft, nämlich, daß die Wirkung eines Ions eine exponentielle Funktion seiner Wertigkeit ist. Meine früheren Versuche über die Entgiftung von Lösungen von Salzen mit einwertigem Metall (NaCl, KCl, LiCl) durch Salze mit zweiwertigem Metall haben gezeigt, daß der Entgiftungskoeffizient, z. B. $NaCl/CaCl_2$, nicht nur kein echter Bruch, sondern sehr groß ist; für $^5/_8$ m NaCl war er ungefähr 2000[2]); während der Koeffizient für die Entgiftung einer $ZnSO_4$-Lösung durch NaCl wieder ein echter Bruch ist, nämlich etwa $^1/_{50}$[3]). (Der Entgiftungskoeffizient war damals nur für wenige Konzentrationen der giftigen Lösung

[1]) W. Koch, Hoppe-Seylers Zeitschr. 63, 432, 1909.
[2]) Loeb, Am. Journ. of Physiol. 6, 411, 1902.
[3]) Loeb und Gies, Arch. f. d. ges. Physiol. 93, 246, 1902.

bestimmt worden.) Wäre also im Falle der Entgiftung von KCl durch Na_2SO_4, SO_4 das entgiftende Ion, so sollte man erwarten, daß die entgiftende Wirkung von Na_2SO_4 nicht 2mal, sondern vielmal größer wäre als die von NaCl. Die Versuche ergeben aber fast ausnahmslos und mit großer Schärfe, daß die entgiftende Wirkung von Na_2SO_4 genau 2mal so groß ist wie die einer äquimolekularen Chlornatriumlösung.

Es wurde der Entgiftungskoeffizient für 0,7 ccm $^m/_8$ KCl mit NaCl und Na_2SO_4 ermittelt. Tabelle XXV und XXVI geben die Resultate.

Tabelle XXV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_8$ KCl pro 100 ccm					
	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$	$^5/_{64}$	$^6/_{64}$ m NaCl
2	1	4	6	6	6	6
3	0	1	5	6	6	6
4		0	1	6	6	6
5			0	6	6	6
6				6	6	6
7				6	6	5
8				6	6	5
9				6	6	5

Tabelle XXIV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,7 ccm $^m/_8$ KCl pro 100 ccm			
	$^1/_{64}$	$^2/_{64}$	$^3/_{64}$	$^4/_{64}$ m Na_2SO_4
2	5	6	7	6
3	0	5	6	4
4		5	5	4
5		5	5	4
6		5	4	4
7		5	4	4
8		5	4	4
9		5	4	3

Die Entgiftungskonzentration ist im Falle von NaCl genau 2mal so hoch wie im Falle von Na_2SO_4, nämlich $^4/_{64}$ m für NaCl und $^2/_{64}$ m für Na_2SO_4. Der Entgiftungskoeffizient ist also in beiden Fällen der gleiche, wenn man Na als das entgiftende Ion ansieht. Man erhält nämlich alsdann in beiden Fällen den Wert $^1/_{18}$ (derselbe Wert, den wir für dieselbe Konzentration von KCl auch in den früheren Versuchen erhielten).

Bei der prinzipiellen Bedeutung des hier behandelten Problems war es nötig, eine größere Zahl von Bestimmungen zu machen. Bei diesen Versuchen war es nur möglich, mit niedrigen Konzentrationen zu arbeiten, weil Lösungen von Na_2SO_4 in Konzentrationen über $^m/_8$ oft schon zu giftig sind, um für diesen Zweck benutzt werden zu können.

Tabelle XXVII und XXVIII geben zwei gleichzeitig angestellte Versuche mit 1,1 und 1,65 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung. Man wird sich aus den vorausgehenden Tabellen erinnern, daß zur Entgiftung von 1,1 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm der Lösung eine $^3/_{32}$ bis $^m/_8$ Lösung von NaCl und für die Entgiftung von 1,65 ccm $^m/_2$ KCl in 100 ccm Lösung eine $^5/_{32}$ bis $^6/_{32}$ m Lösung von NaCl erforderlich war.

Tabelle XXVII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^m/_{100}$	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^3/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6
2	3	5	6	6	3	3
3	0	0	4	6	1	3
4			1	6	1	1
5			0	5	1	1
6				5	1	1
7				5	1	0
8				3	0	
9				2		
16				2		

Tabelle XXVIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm					
	$^m/_{100}$	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^3/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	5	6	6	6	6	5
2	4	2	5	6	6	1
3	0	0	0	3	4	1
4				1	2	1
5				0	2	1
6					2	1
7					1	1
8					1	1
9					1	1
10					1	1
11					1	1
12					1	0
16					1	

Bestimmt man den Entgiftungskoeffizienten in diesen zwei Versuchen, unter der Annahme, daß K durch Na ent-

giftet wird, so erhält man nach Tabelle XXVII etwa den Wert $^1/_{18}$ (da die Entgiftungskonzentration zwischen $^m/_{24}$ und $^m/_{16}$ Na_2SO_4 liegt); und nach Tabelle XXVIII den Wert $^1/_{23}$.

In einem weiteren Versuche wurden die entgiftenden Konzentrationen von Na_2SO_4 für 1,1, 1,65 und 2,2 $^m/_2$ KCl, für Intervalle von $^m/_{100}$ Na_2SO_4 bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle XXIX, XXX und XXXI.

Tabelle XXIX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung						
	H_2O	$^1/_{100}$	$^2/_{100}$	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6
2	4	4	3	6	5	6	6
3	2	1	0	3	2	5	6
4	2	0		0	1	4	4
5	1				0	1	4
6	1					1	4
7	1					0	3
8	1					0	2

Tabelle XXX.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,65 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in							
	H_2O	$^3/_{100}$	$^4/_{100}$	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$	$^8/_{100}$	$^9/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6	6
2	6	2	2	4	6	6	5	5
3	5	0	0	2	3	5	4	2
4	2			1	0	3	3	2
5	0			0		3	3	0
6						2	3	
7						2	3	
8						2	2	

Tabelle XXXI.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm $^m/_2$ KCl pro 100 ccm der Lösung in								
	H_2O	$^5/_{100}$	$^6/_{100}$	$^7/_{100}$	$^8/_{100}$	$^9/_{100}$	$^{10}/_{100}$	$^{11}/_{100}$	$^{12}/_{100}$ m Na_2SO_4
1	6	6	6	6	6	6	6	6	5
2	4	2	4	5	4	5	4	2	2
3	1	0	1	0	2	0	2	1	2
4	0		0		1		1	1	2
5					1		0	0	2
6					1				0
7					1				
8					0				

In diesen Versuchen ist die Entgiftungskonzentration von Na_2SO_4 für 1,1 ccm $^m/_2$ KCl $^6/_{100}$ m, für 1,65 $^m/_2$ KCl $^7/_{100}$ und für 2,2 ccm $^m/_2$ KCl $^8/_{100}$ Na_2SO_4. Berechnet man die Entgiftungskoeffizienten auf Grund dieser Werte unter der Annahme, daß Na das entgiftende Ion ist, so erhält man die folgenden Werte: $^1/_{22}$, $^1/_{17}$ und $^1/_{15}$, also nahezu dieselben Werte, die man bei der Entgiftung von KCl durch NaCl erhält.

Bei der Wichtigkeit des Gegenstandes seien noch einige weitere Tabellen mitgeteilt. In Tabelle XXXII waren 0,55 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 als giftiges und Na_2SO_4 als entgiftendes Salz benutzt.

Tabelle XXXII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 0,55 ccm $^m/_2$ K_2SO_4 pro 100 ccm der Lösung in				
	$^m/_{32}$	$^m/_{24}$	$^m/_{16}$	$^{3\,m}/_{32}$	$^m/_8$ Na_2SO_4
1	1	4	5	4	1
2	0	1	4	2	1
3		0	2	1	1
4			1	1	1
5			1	1	1
6			1	1	0
7			1	1	
8			1	1	
9			1	1	
15			1	1	

Sieht man K als das giftige, Na als das entgiftende Ion an, so erhält man als Entgiftungskoeffizienten $^1/_{28}$, wenn man $^m/_{16}$ als die Entgiftungskonzentration annimmt. Bei geringeren Konzentrationsintervallen von Na_2SO_4 würde der Koeffizient zweifellos etwas größer ausgefallen sein. Aber er liegt nahe genug an $^1/_{17}$, um als weitere Bestätigung zu dienen.

In Tabelle XXXIII und XXXIV handelt es sich wieder um die Entgiftung von 1,1 resp. 2,2 ccm $^m/_2$ KCl durch Na_2SO_4.

Zur Entgiftung von 2,2 ccm $^m/_2$ KCl war bereits eine Konzentration von Na_2SO_4 erforderlich, die über der toxischen Grenze dieses Salzes lag, so daß seine entgiftende Wirkung auf KCl dadurch verdeckt wurde. Die obere giftige Grenze für die toxische Wirkung von Na_2SO_4 (und übrigens auch für NaCl) schwankt etwas, und man erhielt gelegentlich Kulturen, die die zur Entgiftung von 2,2 ccm $^m/_2$ KCl (pro 100 ccm der Lösung) nötige Konzentration von Na_2SO_4 ertragen können. Die Tabelle XXXIV ist ein Beispiel hierfür.

Tabelle XXXIII.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 1,1 ccm $m/_8$ KCl pro 100 ccm der Lösung in				
	$m/_{100}$	$m/_{320}$	$m/_{16}$	$m/_8$	$^3/_{16}$ m Na_2SO_4
1	6	6	5	1	0
2	4	5	4	0	
3	1	4	4		
4	0	0	4		
5			4		
6			3		
7			2		
8			2		
9			2		
10			1		
11			1		
12			1		
21			1		

Tabelle XXXIV.

Nach Tagen	Zahl der überlebenden Fische in 2,2 ccm KCl pro 100 ccm der Lösung in						
	$m/_{100}$	$m/_{50}$	$m/_{16}$	$m/_8$	$^3/_{16}$ m	$m/_4$	$^3/_8$ m Na_2SO_4
1	5	5	6	5	2	2	0
2	3	2	3	5	1	0	
3	0	0	1	2	0		
4			0	1			
5				1			
6				1			
7				0			

Theoretisch sollte die entgiftende Konzentration etwa $^3/_{32}$ m Na_2SO_4 sein. Die Tabelle zeigt, daß der gefundene Wert zwischen $^3/_{32}$ und $^4/_{32}$ m Na_2SO_4 liegt. Wir können also sagen, daß bei der Entgiftung von KCl durch Na_2SO_4 der Entgiftungskoeffizient denselben Wert hat wie bei der Entgiftung von KCl durch NaCl, wenn man K als das giftige und Na als das entgiftende Ion ansieht. Der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$ ist also in Wirklichkeit der Entgiftungskoeffizient $\frac{C_K}{C_{Na}}$, und die antagonistischen Ionen sind K und Na, also die Ionen mit gleicher Ladung.

Ich habe nun Versuche mit anderen Natriumsalzen mit 2 resp. 3wertigem Anion als entgiftenden Salzen angestellt.

nämlich oxalsaurem, bernsteinsaurem und citronensaurem Natrium. Alle drei Salze erwiesen sich aber als so giftig, daß sie für eine Entgiftung von KCl nicht zu gebrauchen waren.

III. Theoretische Erwägungen.

Bei der Klarheit der Resultate kann dieses Kapitel kurz ausfallen. Der nahezu konstante Wert des Entgiftungskoeffizienten $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}}$, sowie die Tatsache, daß die antagonistischen Ionen K und Na sind, legen die folgende Auffassung nahe. Der Fisch und die umgebende Lösung bilden ein 2phasiges System. Die Na- und K-Ionen der umgebenden Lösung konkurrieren um ein gemeinsames Anion, das in begrenzter Menge an der Oberfläche, oder (vielleicht wahrscheinlicher) an einem Teil der Oberfläche des Fisches (den Kiemen) vorhanden ist. Sobald mehr als $^1/_{17}$ der Anionen sich mit K verbinden können, d. h. sobald $\frac{C_K}{C_{Na}}$ in der umgebenden Lösung den Wert $^1/_{17}$ bis $^1/_{18}$ überschreitet, geht das Tier an Kaliumvergiftung zugrunde.

Das kann zwei Gründe haben. Entweder können die Kaliumionen nur in Verbindung mit einem bestimmten, in der Zelle gebildeten und an der Oberfläche vorhandenen organischen Anion, in die Zellen und von da ins Blut und in das Zentralnervensystem diffundieren; oder aber das Überschreiten des Wertes $\frac{C_K}{C_{Na}}$ über den des Entgiftungskoeffizienten ändert auf andere Weise die Durchgängigkeit der Oberflächenlamelle des Tieres für die K-Ionen oder Kaliumsalze.

Es wäre aber irrig, aus diesen Versuchen zu folgern, daß der Mechanismus der antagonistischen Salzwirkung in allen Fällen identisch sei; es ist möglich, daß es verschiedene Mechanismen der Entgiftung eines Salzes durch ein anderes gibt. Es ist die Aufgabe der folgenden Arbeiten, das zur Entscheidung dieser Frage nötige Material herbeizuschaffen.

IV. Zusammenfassung der Resultate.

1. Nach van't Hoff sind KCl und NaCl im Seewasser im Verhältnis von 2,2 Molekülen KCl zu 100 Molekülen NaCl

vorhanden. Es wird darauf hingewiesen, daß auf Grund der neueren Versuche Vernons dieser Wert $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}} = {}^{1}/_{45}$ auch das optimale Verhältnis für diese zwei Salze für die Erhaltung der Herztätigkeit bei der Schildkröte ist.

2. Versuche an einem marinen Fisch, Fundulus, der in weiten Grenzen vom osmotischen Druck des umgebenden Mediums unabhängig ist, haben ergeben, daß das KCl in der Konzentration, in der es im Seewasser vorhanden ist, die Fische in wenigen Tagen tötet, wenn es allein in der Lösung ist. Das gleiche gilt für das NaCl. Dagegen leben die Fische beliebig lange in reinen Lösungen von $CaCl_2$ und $MgCl_2$ von der Konzentration, in der diese Salze im Seewasser vorhanden sind.

3. Es wird gezeigt, daß eine giftige Konzentration von KCl durch Zusatz von NaCl entgiftet werden kann.

4. Der Begriff Entgiftungskoeffizient wird eingeführt. Unter Entgiftungskoeffizient versteht man das Verhältnis der Konzentration des giftigen zu derjenigen des antagonistischen Salzes, die eben zur Entgiftung der Lösung ausreicht.

5. Der Entgiftungskoeffizient von KCl durch NaCl wird für eine Reihe von Konzentrationen von KCl bestimmt, und es wird gefunden, daß derselbe einen nahezu konstanten Wert hat, nämlich $^{1}/_{17}$. Sobald der Wert $\frac{C_{KCl}}{C_{NaCl}} > {}^{1}/_{17}$ oder $^{1}/_{15}$ wird, geht der Fisch an Kaliumvergiftung zugrunde.

6. Es gibt eine obere Grenze für die Konzentration von KCl, oberhalb welcher keine Entgiftung durch NaCl mehr möglich ist. Diese Grenze wird erreicht, wenn etwa 6,6 ccm $^{m}/_{2}$ KCl in 100 ccm der Lösung vorhanden sind.

7. Für die höheren Konzentrationen von KCl, nämlich von 4,4 ccm $^{m}/_{2}$ KCl bis 5,5 oder 6,6 ccm $^{m}/_{2}$ KCl in 100 ccm der Lösung ist der Entgiftungskoeffizient anscheinend ein wenig größer als $^{1}/_{17}$, nämlich $^{1}/_{16}$ bis $^{1}/_{15}$.

8. Wird Na_2SO_4 an der Stelle von NaCl zur Entgiftung von KCl angewendet, so zeigt es sich, daß die zur Entgiftung von KCl nötige Konzentration dieses Salzes genau halb so groß ist wie die erforderliche Konzentration von NaCl. Benutzt man als giftige Lösung K_2SO_4, so läßt sich zeigen, daß die

giftige Wirkung dieses Salzes genau zweimal so groß ist wie die einer äquimolekularen Menge von KCl.

9. Aus diesen Tatsachen wird der Schluß gezogen, daß die giftige Substanz in diesen Versuchen das Kaliumion und die antagonistische oder entgiftende das Natriumion ist, und daß der Antagonismus nicht zwischen den Ionen mit entgegengesetzter Ladung, sondern zwischen denen mit gleicher Ladung stattfindet.

10. Die sub 5 und 9 erwähnten Tatsachen und Schlüsse legen den Gedanken nahe, daß die Entgiftung von K durch Na dadurch zustande kommt, daß K und Na um dasselbe Anion der Oberfläche des Fisches (etwa der Kiemen) konkurrieren, wo dasselbe in begrenzter Menge vorhanden ist. Sobald mehr als $^1/_{17}$ resp. $^1/_{15}$ der Zahl dieser Anionen sich mit K verbinden, geht das Tier an Kaliumvergiftung zugrunde. Wie das möglich ist, wird im letzten theoretischen Abschnitt der Arbeit diskutiert.

11. Es wird erwähnt, daß sehr kleine, aber bestimmte Mengen von NaCl die giftige Wirkung von KCl erhöhen. Diese Tatsache soll in einer der nächsten Mitteilungen ausführlicher behandelt werden.

Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe.

Von

F. Battelli und L. Stern.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Genf.)

(*Eingegangen am 25. Februar 1911.*)

I.

Der Einfluß der Bernstein-, Citronen-, Apfel- und Fumarsäure auf die Atmung des isolierten Froschmuskels ist zuerst von Thunberg mit Hilfe seines Mikrorespirometers untersucht worden. Zu gleicher Zeit untersuchte Thunberg die Wirkung einer großen Anzahl von organischen Säuren.[1] Er fand, daß unter den Di- und Tricarbonsäuren die einen den Gaswechsel stark herabsetzen (Oxalsäure, Maleinsäure u. a.), während die anderen eine geringere hemmende Wirkung ausüben. Die Bernstein-, Fumar-, Apfel- und Citronensäure hingegen steigern mehr oder weniger die Sauerstoffaufnahme. Während die Bernsteinsäure gleichzeitig die Kohlensäurebildung stark vermindert, bewirken die drei letzteren Säuren eine beträchtliche Steigerung der Kohlensäureabgabe.

In einer jüngst erschienenen Arbeit[2]) haben wir gezeigt, daß alle Tiergewebe die Fähigkeit besitzen, die Bernsteinsäure zu Apfelsäure zu oxydieren. Diese Oxydation der Bernsteinsäure weist die größte bisher in den Tiergeweben wahrgenommene Reaktionsgeschwindigkeit auf. Unter den Geweben sind die wirksamsten in der Beziehung die Muskeln, die Leber und die

---

[1]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. IV. Mitteilung. Skand. Arch. 24, 23, 1910.

[2]) Battelli und Stern, Die Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Diese Zeitschr. 30, 172, 1910.

Niere. Fügt man zu einem Gewebe, das noch die Hauptatmung besitzt, wie z. B. der Muskel, Bernsteinsäure hinzu, so tritt die Oxydation dieser Substanz zum großen Teil an Stelle der eigentlichen Atmung des Gewebes, und man erzielt auf diese Weise eine mehr oder weniger starke Steigerung der Sauerstoffaufnahme und zugleich eine Verminderung der Kohlensäurebildung. Nach Thunberg[1]) könnte die Wirkung der Bernsteinsäure durch die Annahme erklärt werden, „daß die normalen Oxydationsprozesse in der Weise ablaufen, daß ein Zwischenvorgang eingeschoben ist, wobei ein unbekannter Stoff in Bernsteinsäure und Kohlensäure, vielleicht auch in mehrere andere Stoffe zerfällt. Wenn Bernsteinsäure in größerer Menge vorhanden ist, wirkt sie auf diesen Prozeß zurückdrängend, dagegen nicht, wenigstens nicht primär, auf die anderen Oxydationsprozesse verhindernd. Die Sauerstoffaufnahme, die ein unabhängiger Teilprozeß ist, wird also nicht beeinflußt, nur die Kohlensäurebildung". Wir haben aber soeben gesagt, daß die spezifische Wirkung der Bernsteinsäure sich auf viel einfachere Weise erklärt.

Auf dem letzten Physiologenkongresse in Wien machte Thunberg im Laufe einer Diskussion die Mitteilung, daß er die Wirkung der eben genannten Säuren auf den Gasaustausch des durch Wasser extrahierten Froschmuskels, den wir als Muskelrückstand bezeichneten, untersucht hat. Die Versuchsergebnisse werden eingehend in einer demnächst (im Skand. Arch. f. Physiol.) erscheinenden Arbeit mitgeteilt werden. Verfasser hat uns liebenswürdig einen Korrekturabzug dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Thunberg findet, daß Zusatz von Bernsteinsäure zum Muskelrückstand die Sauerstoffaufnahme steigert, die Kohlensäureabgabe etwas vermindert, häufiger aber leicht steigert. Weiter findet Thunberg, daß die Apfel-, Fumar- und Citronensäure den Gasaustausch des Muskelrückstandes und namentlich die Kohlensäureabgabe steigern. Der Muskelrückstand verhält sich in der Beziehung wie der ganze Muskel. Er hebt besonders hervor, „daß die Eigenschaften, die Battelli und Stern für ihr Pnein gefunden haben, gar nicht ausschließen, daß es mit einer organischen Säure identisch ist". Wir werden aber sehen, daß die Wirkung des Pneins

[1]) Thunberg, l. c.

von der Wirkung dieser zwei- und dreibasischen organischen Säuren stark verschieden ist.

Die Oxydation dieser Säuren durch den Froschmuskel ist durch die Arbeit von Thunberg nicht erwiesen. Es könnte der Fall sein, daß diese Säuren den eigentlichen Gasaustausch des Muskels aktivieren, ohne hierbei selbst oxydiert zu werden, wie es z. B. die Phosphate tun. In den Versuchen von Thunberg zeigt der durch Zusatz der eben genannten Säuren bewirkte respiratorische Quotient Werte, die stets größer als 1 sind, aber recht große Schwankungen aufweisen, so daß diese Versuchsresultate keine genügende Stütze für die Annahme einer Oxydation dieser Säuren bieten.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir gerade auf Grund der Werte des respiratorischen Quotienten auf eine Oxydation der Apfel-, Fumar- und Citronensäure geschlossen. Fügt man zum Muskelgewebe diese Säuren hinzu, so beobachtet man gewöhnlich eine Steigerung des Gasaustausches, die einem respiratorischen Quotienten 4:3 entspricht. Nun ist dieser respiratorische Quotient derselbe, der einer vollständigen Verbrennung dieser Säuren zu Kohlensäure und Wasser entspricht. Wir hatten außerdem gefunden, daß bei Benutzung des Lebergewebes der durch Zusatz von Fumar- und Apfelsäure bewirkte respiratorische Quotient ebenfalls 4:3 beträgt. Bei Zusatz von Citronensäure zum Lebergewebe erhält man hingegen oft viel höhere Werte. Diese Steigerung des respiratorischen Quotienten ist durch eine energische Spaltung der Citronensäure bedingt, die auch in Sauerstoffabwesenheit vor sich gehen kann. Ähnliche Resultate erzielt man auch bei Anwendung der Niere. Die Citronenensäure wird durch die Leber und die Niere vielleicht in Itakonsäure, Kohlensäure und Wasser gespalten. Wir haben diesen Punkt nicht näher untersucht, sprechen also einfach eine Vermutung aus.

Thunberg[2]) hatte beobachtet, daß die Citronen-, Apfel- und Fumarsäure die Kohlensäureabgabe des Froschmuskels auch

[1]) Battelli und Stern, Oxydation des acides malique, fumarique et citrique par les tissus animaux. Soc. de Biol. 69, 552, 1910.

[2]) Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels durch verschiedene Stoffe. VI. Mitteilung. Skand. Arch. 24, 72, 1910.

in Abwesenheit von Sauerstoff steigert. Thunberg fragt sich, „inwieweit auch sonst die anoxybiotische Atmung durch eine Spaltung von Di- und Polycarbonsäuren bedingt ist; man fragt sich weiter, ob für diese Spaltung die vitale Struktur notwendig ist oder ob spezifische Enzyme, ‚Polycarbonasen' die wirksamen Substanzen sind".

Wir haben bereits erwähnt, daß die Gewebe der höheren Tiere bei Sauerstoffausschluß nicht die Fähigkeit besitzen, aus Apfel- und Fumarsäure Kohlensäure abzuspalten. Unter denselben Versuchsbedingungen bewirken die Leber und die Niere eine recht energische Spaltung der Citronensäure. Die Muskeln hingegen bewirken entweder gar keine oder nur eine geringe Spaltung der Citronensäure bei Sauerstoffausschluß, denn Zusatz von Citronensäure steigert die Kohlensäureabgabe nur wenig oder überhaupt nicht. In vorliegender Arbeit wollen wir uns nicht weiter mit der anoxybiotischen Spaltung der Citronensäure durch die Tiergewebe befassen. Wir haben sie hier bloß erwähnt, weil dieser Spaltungsprozeß die Werte des respiratorischen Quotienten beeinflussen kann. Wie wir bereits gesagt haben, sind es eben die Werte des respiratorischen Quotienten, auf die wir uns hauptsächlich stützen, um in unseren Versuchen eine Verbrennung der genannten Säuren anzunehmen.

Um die Verbrennung der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure zweifellos dartun zu können, müßte man beweisen, daß am Ende des Versuchs die Menge der zerstörten Säure der Menge des aufgenommenen Sauerstoffs oder der produzierten Kohlensäure entspricht. Wir haben zahlreiche Versuche gemacht, um die Menge der zu den Geweben hinzugesetzten Citronensäure zu messen, aber die hierbei erzielten Resultate sind durchaus nicht zufriedenstellend. Eine exakte quantitative Bestimmung geringer Mengen Citronensäure in Gegenwart großer Mengen Gewebe, wie es in unseren Versuchen notwendig war, weist große Schwierigkeiten auf. Noch schwerer schien uns die quantitative Bestimmung der Fumar- und Apfelsäure.

In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir Citronensäure benutzt, weil diese Säure energischer verbrannt wird als die Apfel- und Fumarsäure. Wie wir aber weiter unten sehen werden, sind die wichtigsten Versuchsergebnisse auch durch Versuche mit den beiden letzteren Säuren kontrolliert worden.

II. Methode.

Allgemeine Methode. Das in der Mehrzahl unserer Versuche benutzte Verfahren ist dasselbe, das wir in unseren vorhergehenden Untersuchungen über die Atmung der isolierten Tiergewebe, über die Urikooxydase usw. benutzt haben. Die Gewebesuspension wird in eine große Flasche gebracht und in einer Sauerstoffatmosphäre energisch geschüttelt. Eine Flasche dient als Kontrollprobe. In die andere Flasche fügt man die nötige Citronensäuremenge in Form von citronensaurem Natrium hinzu. Während der ganzen Dauer des Versuches tauchen die Flaschen in das Wasser eines Thermostaten. Am Ende des Versuches wird die aufgenommene Sauerstoffmenge und die produzierte Kohlensäuremenge nach den üblichen Methoden berechnet.

Ist die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe in dem die Citronensäure enthaltenden Reaktionsgemisch größer als in der Kontrollprobe, so schließt man daraus auf eine Oxydation der Citronensäure durch das gegebene Gewebe.

Berechnung der verbrannten Säuremenge. Die Menge der verbrannten Citronen-, Fumar- und Apfelsäure wird aus der Steigerung der Sauerstoffaufnahme berechnet. Es genügt, in Erwägung zu ziehen, daß 1 g Citronensäure zu seiner vollständigen Verbrennung zu Kohlensäure und Wasser 524 ccm Sauerstoff, 1 g Apfelsäure 501 ccm Sauerstoff, und 1 g Fumarsäure 579 ccm Sauerstoff verlangt. Für die Berechnung der verbrannten Fumar- und Apfelsäure kann auch die Steigerung der Kohlensäurebildung in Betracht gezogen werden; betreffend die Citronensäure aber haben wir bereits erwähnt, daß ein Teil der Kohlensäure aus einer Spaltung hervorgehen kann, namentlich wenn man die Leber oder die Niere benutzt.

Zubereitung der Gewebe in frischem Zustande. Diese Zubereitung ist sehr einfach. Das Gewebe wird so schnell wie möglich nach dem Tode des Tieres benutzt, in einer Fleischhackmaschine fein zerrieben und mit Wasser versetzt, so daß ein flüssiges Gemenge entsteht (150 ccm Wasser für je 50 g Gewebe z. B.). Es empfiehlt sich, größere Mengen Gewebe zu benutzen, 50 g z. B., weil auf diese Weise deutlichere Resultate erzielt werden.

Zubereitung des Muskelrückstandes. Der Muskelrückstand wird in folgender Weise bereitet. Der so frisch wie möglich entnommene Muskel wird fein zerrieben, mit dem 3fachen Volumen Wasser versetzt, 5 Minuten lang verrührt und durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt. Zu dem auf diese Weise erhaltenen Muskelrückstand fügt man das 4fache Volumen Wasser hinzu und verfährt im übrigen wie beim nicht gewaschenen Muskel.

Die günstigsten Versuchsbedingungen, um eine energische Verbrennung der genannten Säuren zu erzielen. Die Verbrennungsgeschwindigkeit der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch die isolierten Tiergewebe hängt von mehreren Faktoren ab, unter denen die wichtigsten folgende sind: die Art und der Zustand der benutzten

Gewebe, die Dauer des Schüttelns, die Temperatur des Thermostaten, der osmotische Druck, die Reaktion des Mediums, die Konzentration der zu untersuchenden Säuren und die Sauerstoffspannung.

Der Einfluß der Art und des Zustandes der Gewebe kann nicht durch eine sich auf alle Fälle erstreckende Regel ausgedrückt werden. Die Wirkung der anderen Faktoren ist im Gegenteil ziemlich allgemein. Wir werden später sehen, daß die energischste Verbrennung der genannten Säuren erzielt wird, wenn das Gewebe bei einer Temperatur von 40°, in Gegenwart von einfachem Wasser, in neutralem Medium in einer reinen Sauerstoffatmosphäre geschüttelt wird, wobei die Konzentration der betreffenden Säuren ungefähr 0,4:100 als wasserfreies Natronsalz berechnet, beträgt. Die Menge der verbrannten Säure hängt natürlich von der Dauer des Schüttelns ab; im allgemeinen genügt eine Dauer von 45 Minuten, und man hat somit den Vorteil, die Wirkung von Mikroorganismen auszuschließen.

Die soeben besprochenen Versuchsbedingungen sind auch in der Mehrzahl unserer Versuche realisiert worden.

Die Gewebe stammten teils von durch Verbluten getöteten Laboratoriumstieren, teils wurden sie aus dem Schlachthofe bezogen.

III. Die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch die verschiedenen Tiergewebe.

Wir werden im folgenden Abschnitt sehen, daß die Gewebe, die ihre Hauptatmung nicht mehr besitzen, auch die Fähigkeit verloren haben, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Werden die Gewebe erst längere Zeit nach dem Tode des Tieres entnommen, so ist die Hauptatmung geschwächt und zugleich auch die Oxydationsfähigkeit gegenüber diesen Säuren verringert.

Aus dem Grunde müssen die Gewebe so frisch wie möglich benutzt werden. Bei den Laboratoriumstieren bietet dies keine Schwierigkeit, aber die aus dem Schlachthofe bezogenen Gewebe konnten nicht früher als $1^1/_2$ Stunden nach dem Tode der Tiere zur Verwendung gelangen.

Die von den Laboratoriumstieren (Hund, Kaninchen) stammenden Gewebe konnten bereits 15 bis 20 Minuten nach dem Tode des Tieres auf die Schüttelmaschine gebracht werden, während für die Gewebe des Rindes, des Hammels oder des Pferdes dies erst $1^1/_2$ Stunden nach dem Tode der Tiere geschehen konnte.

In diesen Versuchen wurden 100 g fein zerriebenen Gewebes ohne jede Vorbehandlung mit dem 3fachen Volumen gewöhnlichen Wassers versetzt und in der vorher angegebenen Weise energisch geschüttelt.

In der Tabelle I stellen wir die Resultate, die wir mit den verschiedenen Geweben erzielt haben, zusammen. Jede Zahl entspricht einem Durchschnittswerte von mindestens 4 Versuchen; aber für mehrere Gewebe sind die Durchschnittswerte das Resultat einer bedeutend größeren Anzahl von Versuchen.

Tabelle I.

Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch die verschiedenen Gewebe. Die angeführten Werte bezeichnen die Zahl der Kubikzentimeter des aufgenommenen Sauerstoffs und der entwickelten Kohlensäure durch 100 g Gewebe während einer Schütteldauer von 45 Minuten. Der respiratorische Quotient bezieht sich auf die durch Zusatz der genannten Säuren bewirkte Steigerung (+ Zeichen) des Gasaustausches. Das Gewicht der Citronensäure (C), Fumarsäure (F) und Apfelsäure (M) ist als wasserfreies Natronsalz berechnet.

Gewebe	Citronen-, Apfel- oder Fumarsäure g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm	Respiratorischer Quotient
Muskel von Rind	00	82	107	—
idem	C: 1,5	+66	+98	1,48
idem	F: 1,5	+59	+79	1,34
idem	M: 1,5	+41	+58	1,41
Muskel von Pferd	00	67	99	—
idem	C: 1,5	+42	+70	1,66
idem	F: 1,5	+34	+47	1,38
idem	M: 1,5	+21	+28	1,33
Muskel von Hund	00	48	73	—
idem	C: 1,5	+27	+39	1,44
idem	F: 1,5	+21	+29	1,37
idem	M: 1,5	+16	+24	1,5
Muskel von Kaninchen	00	37	61	—
idem	C: 1,5	+19	+27	1,42
Leber von Rind	00	61	63	—
idem	C: 1,5	+8	+49	6,11
idem	F: 1,5	+6	+10	1,66
idem	M: 1,5	+4	+6	1,50
Leber von Pferd	00	54	75	—
idem	C: 1,5	+26	+77	2,96
idem	F: 1,5	+22	+28	1,27
idem	M: 1,5	+12	+17	1,41
Leber von Hammel	00	83	85	—
idem	C: 1,5	+28	+85	3,03
idem	F: 1,5	+29	+43	1,48
idem	M: 1,5	+14	+20	1,42
Leber von Hund	00	88	103	—
idem	C: 1,5	+64	+116	1,81
idem	F: 1,5	+47	+71	1,51
idem	M: 1,5	+44	+56	1,27
Niere von Rind	00	79	114	—
idem	C: 1,5	+42	+89	2,11
idem	F: 1,5	+37	+56	1,51
idem	M: 1,5	+28	+41	1,46
Niere von Pferd	00	43	72	—
idem	C: 1,5	+14	+27	1,92
idem	F: 1,5	+11	+16	1,45
Lunge von Pferd	00	27	68	—
idem	C: 1,5	+4	+6	—
Lunge von Pferd	00	26	45	—
idem	C: 1,5	+3	+5	—

Um die Berechnung in der Tabelle einfacher zu gestalten, haben wir die Werte der gesamten Kohlensäure angegeben, d. h. die präexistierende Kohlensäure + neugebildete Kohlensäure. Aus dem Grunde ist der respiratorische Quotient der Gewebe auch ohne Zusatz der organischen Säuren höher als 1.

In allen diesen Versuchen waren die Flaschen mit reinem Sauerstoff gefüllt, und die Temperatur des Thermostaten betrug 40° C.

Wie wir bereits hervorgehoben haben, stellen die angeführten Werte Durchschnittszahlen vor. In der Mehrzahl der Versuche weichen die gefundenen Werte nicht beträchtlich von den in der Tabelle angegebenen ab; die Unterschiede überschreiten nicht 50%. Immerhin gibt es hiervon Ausnahmen, und in mehreren Fällen erzielt man für die Muskeln des Rindes oder des Pferdes, die Niere des Rindes usw. sehr geringe Werte, obgleich diese Gewebe sonst ein normales Verhalten aufweisen und sehr schnell nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangten. Man könnte dieses Resultat der Tatsache zuschreiben, daß aus bisher unbekannten Gründen die Hauptatmung eine außergewöhnlich schnelle Abschwächung erfahren hat.

Unter den daraufhin untersuchten Geweben sind es vor allem die Muskeln des Rindes und des Pferdes, die Leber des Hundes und die Niere des Rindes, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure am energischsten oxydieren. Doch darf nicht außer acht gelassen werden, daß die Leber des Hundes sofort nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangte. Wartet man $1^1/_2$ Stunden, wie es für die aus dem Schlachthofe bezogenen Gewebe der Fall ist, so erhält man nur sehr niedrige Werte, wie wir es im folgenden Kapitel zeigen werden.

Es ist natürlich überflüssig zu bemerken, daß die in der Tabelle angegebenen Zahlen nur für die angegebenen Versuchsbedingungen gelten können. Eine Änderung der Versuchsbedingungen würde natürlich eine völlige Änderung der Oxydationswerte verursachen. Es muß ganz besonders hervorgehoben werden, daß die angegebenen Werte durchaus nicht als Ausdruck der Oxydationsintensität dieser Säuren durch die verschiedenen Gewebe im lebenden Organismus aufgefaßt werden dürfen. So dürfen wir zum Beispiel nicht die Behauptung aufstellen, daß im lebenden Tiere der Kaninchenmuskel weniger energisch Citronensäure verbrennt als der Rinder- oder der Pferdemuskel. In der Tat weist der die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkende Prozeß eine große Labilität auf, und es ist leicht möglich, daß dieser Prozeß im Kaninchenmuskel labiler sei, als im Rindermuskel.

Die drei genannten Säuren werden nicht mit derselben Intensität verbrannt. Die Citronensäure scheint in der Beziehung die erste Stelle einzunehmen, in zweiter Linie folgt die Fumarsäure, während die Oxydation der Apfelsäure viel schwächer ist. Thunberg[1]) bekommt für den Froschmuskel ähnliche Resultate.

---

[1]) Thunberg, l. c., IV. Mitteilung.

Der durch die Oxydation dieser Säuren bewirkte respiratorische Quotient beträgt für den Muskel annähernd 1,33, der in der Tat dem respiratorischen Quotienten der völligen Verbrennung dieser Säuren entspricht. In der Mehrzahl der Fälle ist der respiratorische Quotient etwas höher als 1,33, was sich leicht aus dem Umstande erklären läßt, daß die eigene Atmung des Muskels, deren Quotient nicht höher als 1 ist, teilweise durch die Oxydation dieser Säuren ersetzt wird.

Der respiratorische Quotient, der der Oxydation der Fumar- und Apfelsäure entspricht, ist auch für die Leber und die Niere ungefähr 1,33, gewöhnlich etwas höher. Für die Citronensäure ist der respiratorische Quotient sehr hoch, und zwar muß dies der Tatsache zugeschrieben werden, daß in der Leber und der Niere zugleich mit der Oxydation auch eine Spaltung der Citronensäure stattfindet, die zur Kohlensäurebildung führt. Selbstverständlich ist der respiratorische Quotient sehr hoch, wenn die Oxydation unbedeutend ist, da die Kohlensäuremenge, die aus der Spaltung der Citronensäure hervorgeht, keine Veränderung erleidet, während die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs sehr gering ist. So haben wir zum Beispiel bei Benutzung der Rinderleber für den respiratorischen Quotienten einen Durchschnittswert von 6,11 erhalten.

Wird der Versuch unter denselben Bedingungen aber bei Sauerstoffausschluß ausgeführt, so beobachtet man, daß Zusatz von Fumar- und Apfelsäure zum Muskel, zur Leber oder zur Niere keine Kohlensäurebildung hervorruft. Die Citronensäure hingegen kann eine beträchtliche Kohlensäuremenge bilden, wenn sie zum Leber- oder Nierengewebe hinzugesetzt wird. Der Muskel besitzt in einigen Fällen nicht die Fähigkeit, aus Citronensäure bei Sauerstoffausschluß Kohlensäure zu bilden, in anderen Fällen scheint eine anoxybiotische Kohlensäurebildung, wenn auch in geringem Grade, stattzufinden. Wenn ein Muskel die Fähigkeit besitzt, Citronensäure, wenn auch in geringem Maße, anoxybiotisch zu spalten, so ist der durch Citronensäurezusatz bedingte respiratorische Quotient größer als gewöhnlich. So sind die Durchschnittswerte des respiratorischen Quotienten bei der Oxydation der Citronensäure durch den Pferdemuskel höher als die bei der Oxydation der Fumar- und Apfelsäure erzielten.

IV. Labilität des Oxydationsvermögens in den verschiedenen Tiergeweben gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure nach dem Tode.

In früheren Arbeiten[1]) haben wir gezeigt, daß nach dem Tode des Tieres die Hauptatmung je nach den Geweben mehr oder minder schnell abnimmt. Das einfachste Verfahren, um zu erkennen, ob ein gegebenes Gewebe noch die Hauptatmung besitzt, ist zu untersuchen, ob der Gas-

[1]) Battelli und Stern, Recherches sur la conservation de l'activité respiratoire dans les différents tissus après la mort. Journ. de Physiol. et Pathol. génér. 1907, 410.

austausch des betreffenden Gewebes durch Zusatz von Pnein aktiviert werden kann. Ist das Pnein ohne Wirkung, so folgert man, daß das Gewebe die Hauptatmung völlig verloren hat.

Wir haben das Fortbestehen des Oxydationsvermögens der verschiedenen Gewebe gegenüber der Citronensäure untersucht. In gleichzeitig angestellten Parallelversuchen wurde das zu untersuchende Gewebe mit Pnein versetzt, um zu sehen, ob die Verminderung oder das Verschwinden des Oxydationsvermögens gegenüber der Citronensäure mit der Verminderung oder dem Verschwinden der Hauptatmung Hand in Hand geht.

In den hierher gehörigen Versuchen wurde das zu untersuchende Gewebe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (18° C ungefähr) bis zum Beginn des Versuches gehalten. Das Gewebe wurde sodann zerrieben, mit dem 3fachen Volumen gewöhnlichen Wassers oder Muskelextrakts versetzt und hierauf mit oder ohne Citronensäurezusatz unter den im vorigen Kapitel angegebenen Versuchsbedingungen geschüttelt.

Der Muskelauszug wurde in der Weise hergestellt, daß man den zerriebenen Rindermuskel mit dem 2fachen Volumen Wasser versetzte, 5 Minuten lang durchschüttelte und hierauf durch ein Leinwandtuch preßte.

Wir haben zunächst festgestellt, daß die Gewebe die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, schneller verlieren als die Fähigkeit, durch Pnein in bezug auf ihren Gasaustausch aktiviert zu werden. Die Leber des Hundes oxydiert gleich nach dem Tode des Tieres Citronensäure sehr energisch; diese oxydierende Fähigkeit nimmt nach und nach ab und verschwindet ungefähr 2 bis 3 Stunden nach dem Tode fast gänzlich. Die Wirkung des Pneins nimmt ebenfalls allmählich ab und hört größtenteils 3 Stunden nach dem Tode des Tieres auf.

Die Niere des Rindes sowie die Muskeln des Pferdes und des Rindes bewahren längere Zeit die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren. Natürlich ist dieses Oxydationsvermögen um so stärker, je frischer der Muskel ist, doch besteht die oxydierende Wirkung, wenn auch in geringem Grade, noch 24 Stunden oder länger nach dem Tode fort. Das Pnein kann den Gasaustausch dieser Gewebe auch dann noch erhöhen, wenn die oxydierende Wirkung gegenüber Citronensäure bereits verschwunden ist.

In verschiedenen Versuchen haben wir auch beobachtet, daß die oxydierende Wirkung gegenüber der Fumar- und Apfelsäure mit der Oxydation der Citronensäure Hand in Hand geht. Die Beobachtungen, die wir betreffend die Oxydation der Citronensäure gemacht haben, können also ohne weiteres auch auf die beiden anderen Säuren bezogen werden. Wie aus der Tabelle I hervorgeht, wird die Citronensäure am energischsten durch die Leber des Hundes, die Niere des Rindes, die Muskeln des Pferdes und des Rindes oxydiert. Die Leber des Hundes besitzt den Nachteil, dieses Oxydationsvermögen schnell einzubüßen. Die anderen soeben genannten Gewebe bieten hingegen den doppelten Vorteil, ein sehr energisches Oxydationsvermögen zu besitzen und dieses Vermögen längere Zeit zu bewahren.

Die Muskeln des Rindes und des Pferdes sowie die Niere des Rindes eignen sich also am besten für das Studium der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Diese Gewebe sind auch größtenteils in unseren Versuchen benutzt worden.

Die Labilität des die Oxydation dieser Säuren bewirkenden Prozesses bringt es mit sich, daß die Resultate sehr unbeständig sind, und man ist deshalb gezwungen, ein und denselben Versuch mehrmals zu wiederholen, um die Versuchsbedingungen feststellen zu können.

Anderseits bewahren die Gewebe, deren Hauptatmung nach dem Tode am längsten fortdauert, auch am längsten die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren. Endlich besitzen die Gewebe, deren Gasaustausch durch Pnein stark aktiviert wird, auch ein starkes Oxydationsvermögen gegenüber der Citronensäure. So verliert zum Beispiel die Niere des Pferdes, deren Hauptatmung ungefähr 3 Stunden nach dem Tode verschwindet, die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, bereits 2 Stunden nach dem Tode. Die Leber des Pferdes, des Rindes oder des Hammels liefert in bezug auf die Fortdauer ihrer Hauptatmung unbeständige Resultate. Im allgemeinen aber beobachtet man, daß, wenn zu einer gegebenen Zeit die Atmung der Leber durch Pnein stark aktiviert wird, das betreffende Gewebe auch eine energische Oxydation der Citronensäure bewirkt, während umgekehrt die Oxydation der Citronensäure nur gering ist oder überhaupt ausbleibt, sobald die aktivierende Wirkung des Pneins nur gering ist.

Recht beständige Resultate erzielt man bei Anwendung von Hundeleber, Rinderniere, Rinder- und Pferdemuskel.

V. Das Oxydationsvermögen des Muskelrückstandes.

In den bisher besprochenen Versuchen wurde das Gewebe ohne vorherige Behandlung außer der Zerkleinerung benutzt.

Wir haben außerdem eine Anzahl von Versuchen gemacht, in denen der Muskelrückstand, der nach dem eingangs beschriebenen Verfahren dargestellt war, benutzt wurde. Thunberg hat ähnliche Versuche mit dem Froschmuskel angestellt, wie wir bereits erwähnt haben.

In diesen unseren Versuchen haben wir die Beobachtung gemacht, daß der Muskelrückstand des Rindes oder des Pferdes Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bisweilen mit einer Energie oxydiert, die nicht viel hinter der des nicht vorbehandelten Muskels zurücksteht. Häufiger jedoch weist der Muskelrückstand ein viel geringeres Oxydationsvermögen auf als der nicht vorbehandelte Muskel. In einigen seltenen Fällen war die Oxydationswirkung des Muskelrückstandes ausgesprochener als die des nicht gewaschenen Muskels.

Der Muskelrückstand des Hundes und namentlich des Kaninchens oxydiert Citronensäure im allgemeinen schwächer als der entsprechende nicht vorbehandelte Muskel. Diese Beobachtung kann in Zusammenhang mit der Tatsache gebracht werden, daß die eben genannten Muskeln Rückstände liefern, deren respiratorische Tätigkeit durch Pnein nur schwach gesteigert wird.

Wir können also im allgemeinen schließen, daß die Benutzung des Muskelrückstandes für das Studium der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure keinerlei Vorteil gegenüber dem nicht gewaschenen Muskel bietet.

Der respiratorische Quotient, der durch die Oxydation der genannten Säuren unter dem Einflusse des Muskelrückstandes bedingt ist, beträgt ebenfalls ungefähr 1,33. In der Beziehung ist das Resultat häufig deutlicher bei Anwendung des Muskelrückstandes, weil die eigentliche Atmung des Muskels in dem Falle nur gering ist und somit der größte Teil des Gasaustausches auf Rechnung der Oxydation der eben genannten Säuren zu setzen ist.

Der durch einmalige Extraktion bereitete Muskelrückstand des Pferdes oder des Rindes verliert fast vollständig die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren, wenn er nochmals mit dem 4fachen Volumen Wasser extrahiert wird. Eine dritte Wiederholung dieser Behandlung vernichtet dieses Oxydationsvermögen völlig. Der auf diese Weise durch mehrmaliges Auswaschen dargestellte Muskelrückstand weist fast keine Atmungsfähigkeit auf, doch ruft Zusatz von Pnein einen nicht unmerklichen Gasaustausch hervor. Hier zeigt sich von neuem, daß, wie wir es bereits im vorhergehenden Abschnitte gesehen, das Pnein den Gasaustausch der Gewebe noch aktivieren kann, wenn die oxydierende Wirkung derselben gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bereits verschwunden ist.

Der die Oxydation dieser Säuren bewirkende Prozeß scheint gegen die Wasserbehandlung eine geringe Resistenz zu bieten und unterscheidet sich in der Beziehung auffallend von dem der Bernsteinsäureoxydation zugrunde liegenden Prozesse. Wir haben in der Tat in einer früheren Arbeit[1]) gezeigt, daß trotz mehrmals wiederholtem Auswaschen der Muskel seine oxydierende Wirkung auf Bernsteinsäure unvermindert bewahrt.

VI. Versuche, die die Citronensäureoxydation bewirkende Substanz darzustellen.

Wir haben mehrfach versucht, die in den Geweben enthaltene Substanz oder Substanzen darzustellen, die die Fähigkeit besitzen, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren.

Wir haben vergeblich versucht, eine wässerige Lösung dieser Substanz darzustellen. Der fein zerriebene Muskel wird mit dem 2fachen Volumen Wasser versetzt, verschieden lange Zeit (5 bis 20 Minuten) geschüttelt und durch ein Leinwandtuch gepreßt. Man erhält auf diese Weise einen Muskelrückstand und einen Auszug. Letzterer besitzt nicht im geringsten die Fähigkeit, Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Der Muskelrückstand hingegen oxydiert diese Säuren mehr oder weniger energisch, wie wir es bereits gesehen haben.

Es ist uns nicht gelungen, die aktiven Substanzen durch Alkohol- oder Acetonbehandlung darzustellen. Das fein zerriebene Gewebe wird 5 Minuten lang mit dem 2fachen Volumen Alkohol oder Aceton ver-

[1]) Battelli und Stern, l. c.; diese Zeitschr. 30, 172, 1910.

rührt, durch ein Leinwandtuch stark ausgepreßt und der auf diese Weise erhaltene Rückstand im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Das auf diese Weise dargestellte Gewebepulver besitzt keine oxydierende Fähigkeit gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

In der Beziehung verhalten sich die die Citronensäureoxydation bewirkenden Substanzen ähnlich den Substanzen, die in der Hauptatmung die wichtigste Rolle spielen, oder wie die die Bernsteinsäure zu Apfelsäure oxydierenden Körper. Die wässerigen Auszüge sowie die Alkohol- und Acetonniederschläge der Gewebe besitzen nicht die Hauptatmung und oxydieren auch nicht die Bernsteinsäure. Hingegen sind die Substanzen, die bei der akzessorischen Atmung mitwirken, sowie die Urikooxydase und die Alkoholoxydase in Wasser löslich und können durch Alkohol und Aceton präcipitiert werden.

VII. Einfluß der Reaktion des Mediums.

Die Reaktion des Mediums wird in den hierher gehörigen Versuchen durch Zusatz von NaOH oder HCl erhalten.

Es muß hierbei bemerkt werden, daß die Verbrennung des citronensauren Natriums die Reaktion während des Versuches beständig in der Weise abändert, daß die Reaktion stärker alkalisch oder weniger sauer wird. Doch sind diese Änderungen nur geringfügig, da die Menge der verbrannten Citronensäure relativ unbedeutend ist.

In der Tabelle II stellen wir die Resultate zweier typischer Versuchsreihen zusammen.

Tabelle II.

Einfluß der Reaktion des Mediums auf die Oxydation der Citronensäure. Jede Flasche enthält 100 g frischen Rindermuskels, 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Dauer des Schüttelns 45 Minuten. Temperatur des Thermostaten 40° C.

Reaktion des Mediums	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Neutral gegen Lackmus	00	102	141
idem	1,50	+ 73	+ 98
NaOH 1:5000	00	126	163
idem	1,50	+ 71	+ 99
NaOH 1:2000	00	150	182
idem	1,50	+ 29	+ 41
NaOH 1:1500	00	154	180
idem	1,50	+ 11	+ 14
NaOH 1:1000	00	18	47
idem	1,50	+ 1	+ 3
Neutral gegen Lackmus	00	87	125
idem	1,50	+ 64	+ 91
HCl 1:4000	00	59	92
idem	1,50	+ 62	+ 86
HCl 1:2000	00	31	61
idem	1,50	+ 37	+ 53
HCl 1:1000	00	16	43
idem	1,50	+ 13	+ 18

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse sind durch mehrere andere Versuche bestätigt worden. Die frische Rinderniere zeigt ein ähnliches Verhalten in bezug auf die Oxydation der Citronensäure.

Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß, wenn die Reaktion des Mediums neutral oder leicht alkalisch oder leicht sauer ist, die Oxydation der Citronensäure nahezu die gleiche Intensität aufweist. Mit steigender Säure- oder Alkalikonzentration nimmt die Oxydationsenergie ab und hört endlich fast gänzlich auf.

Vergleicht man den Reaktionsverlauf der Citronensäureoxydation mit dem der eigentlichen Atmung des Muskels, so beobachtet man folgendes:

Eine schwache Alkalinität (NaOH 1:5000 oder 1:4000 z. B.) steigert die eigentliche Atmung, ohne die Oxydation der Citronensäure zu stören; bei einer Alkalinität von ungefähr 1:2000 NaOH bemerkt man eine größere Steigerung der eigentlichen Atmung des Muskels, während hingegen die Citronensäureoxydation stark vermindert oder völlig aufgehoben ist. Man kann also annehmen, daß eine mäßige Alkalinität für die Oxydation der in den Muskeln selbst enthaltenen Substanzen günstiger ist als für die Oxydation der hinzugesetzten Citronensäure.

Eine schwache Acidität (HCl 1:5000 oder 1:4000 z. B.) setzt die eigentliche Atmung des Muskels schon bedeutend herab, ohne die Oxydation der Citronensäure merklich zu vermindern. Häufig ist die Oxydation der Citronensäure leicht vermehrt, namentlich wenn man zu den Versuchen den Muskelrückstand des Rindes benutzt.

Diese Wirkung des schwach sauren Mediums kann auf zweierlei Art erklärt werden. Man könnte annehmen, daß in leicht saurem Medium die Oxydation der in den Muskeln selbst enthaltenen Substanzen verringert ist, während die Oxydation der hinzugesetzten Citronensäure keine Änderung erleidet. Oder man könnte auch voraussetzen, daß der oxydative Vorgang keinerlei Störung erleidet, daß aber ein anderer für die Hauptatmung der Gewebe notwendiger Vorgang (z. B. eine Hydrolyse) eine Abschwächung erleidet.

VIII. Einfluß der Temperatur.

In einer Reihe von Versuchen haben wir den Einfluß der Temperatur auf die Oxydationsintensität der Citronensäure geprüft. Die Gewebesuspension wurde auf die gewünschte Temperatur erwärmt, nachdem die das Reaktionsgemisch enthaltende Flasche mit reinem Sauerstoff gefüllt worden war, darauf wurde die nötige Menge Citronensäure hinzugefügt und dann erst mit dem Schütteln begonnen.

In der folgenden Tabelle ist eine typische Versuchsreihe wiedergegeben, deren Resultate durch andere in derselben Weise ausgeführte Versuche bestätigt sind.

Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, daß das Temperaturoptimum für die Oxydation der Citronensäure bei ungefähr 40° liegt. Dieses Optimum entspricht dem für die Hauptatmung und für die Oxydation der Bernsteinsäure gefundenen.

Tabelle III.

Einfluß der Temperatur auf die Oxydationsintensität der Citronensäure. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten. Jede Flasche enthält 100 g sehr frischen Gewebes und 300 ccm Wasser.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Temperatur in Zentigraden	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	30	57	78
idem	1,5	30	+ 39	+ 56
idem	00	40	81	102
idem	1,5	40	+ 57	+ 80
idem	00	45	50	68
idem	1,5	45	+ 46	+ 65
idem	00	50	38	52
idem	1,5	50	+ 29	+ 40
idem	00	55	23	32
idem	1,5	55	+ 7	+ 10

Die auf 70° erwärmten Gewebe verlieren vollständig die Fähigkeit, Citronensäure zu oxydieren.

IX. Einfluß der Citronensäurekonzentration.

Die Konzentration der Citronensäure übt einen gewissen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben aus. In der folgenden Tabelle stellen wir die Resultate einer typischen Versuchsreihe zusammen.

Tabelle IV.

Einfluß der Konzentration der Citronensäure auf die Oxydationsgeschwindigkeit derselben. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 100 g Gewebe und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Pferd	00	92	124
idem	0,10	+ 24	+ 36
idem	0,20	+ 35	+ 51
idem	0,50	+ 49	+ 70
idem	1,00	+ 59	+ 82
idem	1,50	+ 65	+ 90
idem	2,00	+ 57	+ 85
idem	3,00	+ 26	+ 37

Aus den in der Tabelle IV zusammengestellten Versuchsergebnissen ersieht man deutlich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit der Citronensäure bis zu einem gewissen Maximum mit steigender Konzentration zu-

nimmt, darauf aber wieder abnimmt. In der hier wiedergegebenen Versuchsreihe beträgt das Konzentrationsoptimum 1,5 g wasserfreien, citronensauren Natriums für 400 ccm Reaktionsgemisch, also ungefähr 0,4 : 100. Doch ist dieses Resultat nicht konstant, und das Konzentrationsoptimum weist in den verschiedenen Versuchen Abweichungen auf, die aber nur gering sind.

X. Einfluß der Sauerstoffspannung.

Die in den vorhergehenden Abschnitten mitgeteilten Versuche sind in einer Atmosphäre reinen Sauerstoffs ausgeführt worden. Wird der Sauerstoff durch gewöhnliche Luft ersetzt, so wird die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure beträchtlich vermindert. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die Oxydationsenergie in reinem Sauerstoff zweimal größer ist als in einer gewöhnlichen Luftatmosphäre.

In der Beziehung zeigt die Oxydation der Citronensäure ganz dasselbe Verhalten wie die Hauptatmung und die Oxydation der Bernsteinsäure, die in reinem Sauerstoff ebenfalls viel energischer verlaufen als in gewöhnlicher Luft. Die akzessorische Atmung sowie die Oxydation des Alkohols durch die Alkoholoxydase weisen hingegen in gewöhnlicher Luft dieselbe Energie auf wie in reinem Sauerstoff.

XI. Einfluß der Versuchsdauer.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß der die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkende Prozeß eine recht große Labilität aufweist und daß diese Labilität von einem Versuche zum andern wechselt. Es war folglich auch zu erwarten, daß die Verbrennungsenergie im Laufe des Versuches schnell abnehmen und daß die hierbei erzielten Resultate nicht konstant sein würden. Dies ist in der Tat auch der Fall.

Man kann im allgemeinen sagen, daß die Verbrennung der Citronensäure durch den Rinder- oder Pferdemuskel in gewöhnlichem Wasser und bei einer Temperatur von 40° während der ersten 30 Minuten langsam abnimmt, und hierauf gewöhnlich recht schwach wird oder selbst völlig aufhören kann. In einigen Fällen dauert jedoch die Verbrennung 45 Minuten lang mit ziemlich gleicher Energie fort und nimmt hierauf schnell ab.

Vergleicht man die Dauer der Citronensäureverbrennung mit der Dauer der eigentlichen Atmung der Muskeln, so bemerkt man auch hier Unregelmäßigkeiten. In einigen Fällen nimmt die eigentliche Atmung der Muskeln schneller ab als die Verbrennung der Citronensäure, in anderen Fällen findet das Gegenteil statt.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die praktische Schlußfolgerung, daß es unnütz ist, die Dauer des Schüttelns auf mehr als 45 Minuten auszudehnen, um fast das Maximum der Citronensäureverbrennung zu erzielen.

XII. Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die Gewebe.

Wir haben die Beobachtung gemacht, daß der Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die Muskeln verschieden ist, je nachdem die Muskeln mehr oder weniger schnell nach dem Tode der Tiere zur Verwendung gelangen.

Wird der Muskel des Pferdes oder des Rindes schnell nach dem Tode benutzt ($1^1/_2$ Stunden z. B.), so bewirkt Zusatz von dreifachem Volumen Blut keine oder eine kaum merkliche Verminderung des Oxydationsvermögens gegenüber Citronensäure. Mit anderen Worten — Zusatz von Citronensäure bewirkt annähernd dieselbe Steigerung des Gasaustausches der Muskeln, gleichgültig, ob diese in Wasser oder Blut suspendiert sind. Selbstverständlich ist die eigentliche Atmung des Muskels durch Zusatz von Blut stark gesteigert, wie wir es bereits in früheren Arbeiten gezeigt haben.

Wird der Muskel 4 oder 5 Stunden nach dem Tode des Tieres benutzt, so vollzieht sich die Oxydation der Citronensäure mit einer beträchtlichen Energie, wenn das Gewebe in Wasser suspendiert ist, hingegen ist diese Oxydation gering oder kaum merklich in Gegenwart von Blut. Zusatz von Blut steigert auch in dem Falle die eigentliche Atmung des Muskels bedeutend, aber Zusatz von Citronensäure bewirkt keine weitere Steigerung des Gasaustausches.

In bezug auf die Oxydation der Citronensäure durch die Muskeln ist also die Wirkung des Blutes ähnlich der des Kochsalzes, wenn der Muskel nicht mehr ganz frisch ist. Beim sehr frischen Muskel ist die Wirkung des Blutes von der des Kochsalzes streng verschieden.

Der Einfluß des Blutes auf die Citronensäureoxydation durch die frische Rinderniere ist ebenfalls unbeständig. In einigen Fällen war diese Oxydation in Gegenwart von Blut ganz dieselbe wie in gewöhnlichem Wasser, in einigen anderen Fällen war sie hingegen mehr oder weniger vermindert. Nur in einem Falle haben wir eine bedeutende Steigerung der Oxydation in Gegenwart von Blut beobachtet. Diese einander widersprechenden Resultate könnten durch den verschiedenen Grad der Frische der Gewebe in bezug auf den Prozeß der Hauptatmung bedingt sein.

Das Blut selbst oxydiert Citronensäure nicht merklich.

XIII. Einfluß der Chloride und der Phosphate.

In allen bisher mitgeteilten Versuchen wurde zum zerriebenen Gewebe gewöhnliches Wasser hinzugesetzt. In besonderen Versuchen wurde auch der Einfluß mehrerer Salze und namentlich des Chlornatriums und des Natriumphosphats untersucht.

In der Tabelle V stellen wir einige typische Versuche zusammen.

Bei der Berechnung der Salzkonzentration wurde 1 g Gewebe wie 1 ccm Flüssigkeit betrachtet. Das Phosphat wurde als wasserhaltiges Na_2HPO_4, $12\,H_2O$ berechnet.

Tabelle V.

Einfluß der Chloride und Phosphate auf die Oxydation der Citronensäure. Jede Flasche enthält 100 g frischen Gewebes und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten und die Temperatur des Thermostaten 40°.

Gewebe	Salzkonzentration pro 1000	Citronensaures Natrium g	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	00	96	142
idem	00	1	+ 72	+ 99
idem	NaCl: 0,8	00	121	163
idem	idem	1	+ 83	+ 114
idem	NaCl: 1,6	00	139	180
idem	idem	1	+ 37	+ 53
idem	NaCl: 3,2	00	134	171
idem	idem	1	+ 22	+ 31
idem	NaCl: 4,8	00	122	156
idem	idem	1	− 4	+ 3
idem	NaCl: 6,4	00	99	133
idem	idem	1	− 12	− 2
Muskel von Rind	00	00	84	126
idem	00	1	+ 63	+ 89
idem	Na_2HPO_4: 1	00	98	139
idem	idem	1	+ 61	+ 85
idem	Na_2HPO_4: 2	00	121	160
idem	idem	1	+ 54	+ 77
idem	Na_2HPO_4: 5	00	157	193
idem	idem	1	+ 29	+ 38
idem	Na_2HPO_4: 10	00	152	186
idem	idem	1	+ 13	+ 17

Es darf nicht außer acht gelassen werden, daß die in der Tabelle angeführten Versuchstypen nur ungefähr eine Idee von den in den verschiedenen Versuchen erzielten Resultaten geben. Die Resultate sind durchaus nicht konstant, und die Abweichungen können mitunter recht groß sein, namentlich in bezug auf den Einfluß der Salzkonzentration.

Im allgemeinen läßt sich sagen, daß das Chlornatrium in schwacher Konzentration die eigentliche Atmung des Muskels bedeutend steigert. Die Atmungsintensität nimmt von neuem deutlich ab, wenn das Chlornatrium eine Konzentration von ungefähr 6:1000 erreicht.

Die Verbrennung der Citronensäure ist etwas gesteigert, wenn die Konzentration des Chlornatriums sehr schwach ist (1:1000 z. B.), aber sobald die Konzentration etwas ansteigt (2 bis 3:1000 z. B.), wird die Verbrennung der Citronensäure bedeutend vermindert, und wenn die Konzentration des Chlornatriums 5:1000 beträgt, bewirkt der Zusatz von Citronensäure keine Steigerung des Gaswechsels, sondern eher eine Verminderung.

Wie hieraus zu ersehen, ist die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Verbrennung der Citronensäure stärker als auf die Oxydation der in dem Muskel selbst enthaltenen Substanzen. In der Tat

nimmt mit steigender Konzentration des Chlornatriums die Verbrennung der Citronensäure viel schneller ab als die eigentliche Atmung des Muskels.

Wir haben bereits gesehen, daß in Gegenwart von Blut der sehr frische Muskel Citronensäure ebenso stark oxydiert, wie in gewöhnlichem Wasser. Da nun im Blutserum das Chlornatrium eine Konzentration von ungefähr 6:1000 erreicht, müßte die Verbrennung der Citronensäure verhindert sein. Man könnte also annehmen, daß im Blute Substanzen enthalten sind, die die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Verbrennung der Citronensäure aufheben.

Auf die Oxydation der Citronensäure durch die Niere wirkt Chlornatrium ähnlich wie auf den Muskel, mit dem Unterschied jedoch, daß die Oxydation der Citronensäure durch die Niere viel weniger beeinflußt wird als die Oxydation durch den Muskel. In der Tat beginnt die hemmende Wirkung des Chlornatriums auf die Citronensäureoxydation durch die Niere erst bei einer Konzentration von 4 bis 5:1000.

Die Wirkung des Natriumphosphats weist eine gewisse Analogie mit der Alkaliwirkung auf. In schwacher Konzentration (1:1000 z. B.) steigert das Natriumphosphat die eigentliche Atmung des Muskels, ohne die Citronensäureoxydation zu beeinflussen. Mit steigender Konzentration des Natriumphosphats nimmmt die Atmung des Muskels bedeutend zu, während hingegen die Oxydation der Citronensäure stetig abnimmt. Die Niere des Rindes zeigt im allgemeinen dasselbe Verhalten.

XIV. Einfluß des Fluornatriums.

Unter den Giften wollen wir der Wirkung des Fluornatriums einen besonderen Platz anweisen, da es in ausgesprochener Weise die Fähigkeit besitzt, in passender Konzentration die Hauptatmung der Gewebe herabzusetzen, ohne ihr Oxydationsvermögen gegenüber der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu verringern; häufig ist dieses Oxydationsvermögen sogar erhöht. In der folgenden Tabelle stellen wir 2 typische Versuchsreihen zusammen.

Die zwei in der Tabelle VI angeführten Versuchsreihen geben einen allgemeinen Begriff von den mit dem Fluornatrium erzielten Resultaten; selbstverständlich aber beobachtet man recht große Abweichungen von einem Versuche zum anderen. Man bemerkt, daß die eigentliche Atmung des Muskels durch Fluornatrium bereits in einer Konzentration von 1:1000 stark herabgesetzt ist; die Abschwächung nimmt mit steigender Konzentration des Fluornatriums sehr schnell zu. Die Oxydation der Citronensäure nimmt hingegen bis zu einer gewissen Grenze mit steigender Konzentration des Fluornatriums zu. Es kommt nicht selten vor, daß bei einer Fluornatriumkonzentration von 1 bis 3:1000 die Summe des durch die eigentliche Atmung des Muskels und durch die Oxydation der Citronensäure verbrauchten Sauerstoffs ungefähr konstant bleibt. Die Resultate sind bei Anwendung der Rinderniere noch deutlicher. So kann man z. B. die Beobachtung machen, daß in Gegenwart von Fluornatrium in einer Konzentration von 3:1000 die Oxydation der Citronensäure

stärker ist als sonst. Die Wirkung des Fluornatriums auf die eigentliche Atmung der Niere scheint viel weniger ausgesprochen als auf die Atmung des Muskels, weil in den in der Tabelle wiedergegebenen Versuchen der Gasaustausch der Niere hauptsächlich durch die akzessorische Atmung bewirkt wird, auf die das Fluornatrium eine verhältnismäßig geringe Wirkung ausübt.

Tabelle VI.

Einfluß des Fluornatriums auf die Intensität der Citronensäureoxydation. Die Dauer des Schüttelns beträgt 45 Minuten, die Temperatur des Thermostaten 40°. Jede Flasche enthält 100 g Gewebe und 300 ccm Wasser und ist mit reinem Sauerstoff gefüllt.

Gewebe	Citronensaures Natrium g	Konzentration des Fluornatriums	Aufgenommener Sauerstoff ccm	Entwickelte Kohlensäure ccm
Muskel von Rind	00	00	98	137
idem	1	00	+ 74	+ 97
idem	00	1:1000	62	98
idem	1	idem	+ 68	+ 93
idem	00	2:1000	46	81
idem	1	idem	+ 72	+ 98
idem	00	3:1000	36	69
idem	1	idem	+ 78	+ 105
idem	00	10:1000	11	42
idem	1	idem	+ 42	+ 57
Niere von Rind	00	00	102	124
idem	1	00	+ 54	+ 82
idem	00	1:1000	108	129
idem	1	idem	+ 62	+ 98
idem	00	2:1000	97	118
idem	1	idem	+ 64	+ 103
idem	00	3:1000	82	101
idem	1	idem	+ 76	+ 118
idem	00	10:1000	52	71
idem	1	idem	+ 38	+ 82

Ähnliche Resultate erzielt man bei Verwendung von Fumar- oder Apfelsäure an Stelle der Citronensäure.

Eine interessante Beobachtung ist, daß die Wirkung des Fluornatriums einen Gegensatz zur Wirkung des Chlornatriums bietet. In passenden Konzentrationen begünstigt das Chlornatrium die eigentliche Hauptatmung der Gewebe, während die Oxydation der Citronensäure vermindert wird. In entsprechenden Konzentrationen bewirkt das Fluornatrium das Gegenteil. Im allgemeinen kann man sagen, daß in dieser Beziehung das Chlornatrium sich wie die Alkalien oder das Natriumphosphat verhält, während die Wirkung des Fluornatriums der Wirkung der Säuren ähnlich ist, aber in viel stärker ausgesprochener Weise.

Zu bemerken ist endlich noch, daß in einer Konzentration von 1:100 das Fluornatrium die Oxydation der Bernsteinsäure vollständig aufhebt, während die Oxydation der Citronensäure noch recht energisch vor sich geht.

XV. Einfluß einiger anderer Gifte (Blausäure und arsenige Säure, Aldehyde, Galle).

Außer dem Fluornatrium haben wir auch die Wirkung einiger Gifte untersucht, deren Einfluß auf die eigentliche Atmung der Gewebe sowie auf die Oxydation der Bernsteinsäure wir bereits in früheren Arbeiten studiert hatten. Die hierher gehörigen Versuche sind ausschließlich am Muskel von Rind oder Pferd in gewöhnlichem Wasser ausgeführt worden.

Man kann im allgemeinen sagen, daß die Wirkung des Giftes um so energischer ist und bei einer um so geringeren Dosis auftritt, je frischer und aktiver der Muskel ist. Die Versuche, deren Ergebnisse wir hier auseinandersetzen wollen, sind an Muskeln von mittlerer Aktivität ausgeführt worden.

Unter den daraufhin untersuchten Substanzen besitzt die Blausäure die stärkste Giftwirkung, und zwar zeigt sich die hemmende Wirkung recht deutlich schon in einer Konzentration von 1:100000. In einer Konzentration von 1:3000 hebt die Blausäure die Citronensäureoxydation nicht vollständig auf.

Die arsenige Säure vermindert recht deutlich die eigentliche Hauptatmung des Muskels schon in einer Konzentration von 1:50000, aber die Oxydation der Citronensäure wird erst bei einer Konzentration von 1:10000 merklich herabgesetzt.

Der Formaldehyd vernichtet fast vollständig die Citronensäureoxydation in einer Konzentration von 1:2000, und der Salicylaldehyd übt die gleiche Wirkung in einer Konzentration von 2:1000. Die Wirkung des Äthylaldehyds ist viel schwächer; erst in einer Konzentration von 2:1000 bewirkt Äthylaldehyd eine merkliche Verminderung der Citronensäureoxydation.

Die Galle hemmt ebenfalls die Citronensäureoxydation recht energisch. Zusatz von 5 ccm Rindergalle zu 50 g Muskel hebt diese Oxydation fast völlig auf.

Diese eben genannten Gifte wirken demnach in ziemlich derselben Weise auf die Hauptatmung wie auf die Oxydation der Citronensäure durch den Muskel. Wir haben bereits erwähnt, daß das Fluornatrium in dieser Beziehung ein anderes Verhalten aufweist.

XVI. Beziehung zwischen der Hauptatmung und der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

In früheren Arbeiten waren wir zur Schlußfolgerung gelangt, daß die Hauptatmung der Gewebe durch das Zusammenwirken des fundamentalen Atmungsprozesses und des Pneins zustande komme. Das Pnein ist in Wasser löslich und sehr beständig. Der fundamentale Atmungsprozeß haftet fest an den unlöslichen Teilen der Gewebe und ist äußerst labil.

Der Aktivitätsgrad des fundamentalen Atmungsprozesses kann in einigen Fällen direkt durch Messung des Gasaustausches des Gewebes

selbst bestimmt werden, in den anderen Fällen hingegen kann diese Aktivität nur durch die Wirkung des Pneinzusatzes gemessen werden. So kann z. B. die Niere des Rindes einige Stunden nach dem Tode des Tieres einen ziemlich schwachen Gasaustausch aufweisen, aber es genügt, einen wässerigen Muskelauszug (Pnein) hinzuzusetzen, um eine sehr große Atmungstätigkeit hervorzurufen.

Wir haben bisher noch nicht bestimmen können, ob das Pnein ein Aktivator des fundamentalen Atmungsprozesses ist oder ob es die zum Verbrennen geeigneten Körper liefert.

Nun haben wir im Kapitel IV auseinandergesetzt, daß, wenn der fundamentale Atmungsprozeß eine große Tätigkeit aufweist, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure energisch oxydiert werden. Ist der fundamentale Atmungsprozeß abgeschwächt, so wird auch die Oxydation der genannten Säuren gering sein, und wenn endlich der fundamentale Atmungsprozeß vernichtet ist, so hört auch die Oxydation dieser Säuren völlig auf.

Wir schließen aus diesen Beobachtungen, daß die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch den fundamentalen Atmungsprozeß bewirkt wird.

Immerhin bemerkt man im Verhalten der Hauptatmung und der Verbrennung der eben genannten Säuren in einigen Fällen einige Abweichungen. Je nach den Versuchsbedingungen kann man eine energische Oxydation der in den Geweben enthaltenen Substanzen sowie der hinzugesetzten eben genannten Säuren beobachten; unter anderen Versuchsbedingungen wird der fundamentale Atmungsprozeß vorzugsweise die den Geweben eigentümlichen Substanzen angreifen und wieder unter anderen Bedingungen hauptsächlich die hinzugesetzte Citronen-, Fumar- und Apfelsäure verbrennen. So beobachtet man z. B., daß der sehr frischer Muskel in gewöhnlichem Wasser eine energische Atmungstätigkeit aufweist und zugleich die hinzugesetzte Citronensäure energisch verbrennt. In genügend alkalischem Medium oder in Gegenwart von Kochsalz in genügender Konzentration verbrennt derselbe Muskel fast ausschließlich seine eigenen Substanzen und oxydiert kaum oder gar nicht die hinzugesetzte Citronensäure. In Gegenwart von NaFl in genügender Konzentration ist die Sauerstoffmenge, die zur Verbrennung der Citronensäure verbraucht wird, größer als die zur Verbrennung der im Muskel selbst enthaltenen Substanzen verbrauchte.

XVII. Vergleich zwischen der Wirkung des Pneins und der der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

Wir haben bereits erwähnt, daß Thunberg aus seinen am Froschmuskel angestellten Versuchen zur Schlußfolgerung gelangt, „daß die Eigenschaften, die Battelli und Stern für ihr Pnein gefunden haben, gar nicht ausschließen, daß es mit einer organischen Säure identisch ist".

Aus unseren Versuchen ergibt sich aber, daß das Pnein nicht als ein Gemisch von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufgefaßt werden kann. Der wichtigste Unterschied besteht im respiratorischen Quotienten.

Der respiratorische Quotient, der durch den Pneinzusatz bewirkt wird, übersteigt nicht den Wert 1, während der respiratorische Quotient, der durch die Oxydation der genannten Säuren bedingt wird, ungefähr den Wert 1,35 aufweist.

Außerdem existieren noch andere Unterschiede. So aktiviert das Pnein den respiratorischen Gasaustausch der Gewebe noch zu einer Zeit, wo dieselben die Fähigkeit bereits verloren haben, die genannten Säuren zu oxydieren, z. B. wenn die Gewebe zu spät nach dem Tode des Tieres zur Verwendung gelangen (siehe Kapitel IV) oder wenn dieselben wiederholt gewaschen worden sind (siehe Kapitel V).

Die Steigerung des Gasaustausches, die durch Zusatz von Pnein zum Muskelrückstande, zur Niere oder zur Leber gleich nach dem Tode des Tieres in Gegenwart von Wasser bewirkt wird, ist bedeutend größer als die durch Zusatz von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure bewirkte. Die Mengen dieser Säuren, die demnach im Muskelextrakte enthalten sein müßten, dürften recht bedeutend sein und den üblichen analytischen Methoden zugänglich sein, während es bisher nicht gelungen ist, sie in den verschiedenen Tiergeweben nachzuweisen.

Die Wirkung der Bernsteinsäure ist von der des Pneins ganz verschieden. Es genügt, in Erwägung zu ziehen, daß die Oxydation dieser Säure von keiner Kohlensäurebildung begleitet ist.

XVIII. Allgemeine Betrachtungen.

Die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch die Tiergewebe ist hauptsächlich aus zweierlei Gründen interessant.

Erstens ist die Oxydation dieser Säuren das erste Beispiel von gut definierten Substanzen, die eine direkte und völlige Verbrennung durch die isolierten Tiergewebe erleiden. Zweitens scheint diese Verbrennung durch denselben Prozeß bewirkt zu sein wie die Hauptatmung der Gewebe.

Betrachtet man genauer die Resultate der Untersuchungen über die Oxydation von Substanzen von bestimmter chemischer Struktur durch die Tiergewebe, so bemerkt man vor allem, daß es bisher nicht gelungen ist, Kohlenhydrate, Fette, Fettsäuren, Glycerin oder Eiweißstoffe zu oxydieren.

Unter den Substanzen, die durch die isolierten Tiergewebe oxydiert werden können, erleiden die meisten eine viel zu langsame Oxydation, um einen merklichen Einfluß auf den Gasaustausch auszuüben. Wir wollen uns hier nicht weiter mit denselben befassen. Man kann immerhin behaupten, daß diese verschiedenen Substanzen eine nur oberflächliche Oxydation unter der Einwirkung spezieller Oxydationsfermente aufweisen.

Die Zahl der Substanzen, durch deren schnelle Oxydation der Gasaustausch der isolierten Tiergewebe merklich beeinflußt werden kann, ist ziemlich klein. Zu nennen sind: Alkohol, Harnsäure und vor allem Bernsteinsäure. Die Oxydation dieser eben genannten Substanzen ist keine tiefgehende und führt nur zur Bildung von intermediären Produkten: die Harnsäure wird zu Allantoin, die Bernsteinsäure zu Apfelsäure oxydiert.

Die Tatsache, daß hinzugesetzte Substanzen von bestimmter chemischer Struktur, wie die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure, durch die isolierten Tiergewebe völlig verbrannt werden, steht in der Geschichte der Gewebeatmung vereinzelt da.

Wir wollen nun zu den Prozessen übergehen, die die Oxydation der bisher bekannten Substanzen mit einer genügenden Schnelligkeit bewirken, um den Gasaustausch der Gewebe deutlich zu beeinflussen. Wir werden sofort bemerken, daß die Oxydationen des Alkohols, der Harnsäure, der Bernsteinsäure sowie der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure durch verschiedene Prozesse bedingt sind, die drei gänzlich verschiedene Typen vorstellen.

Den ersten Typus dieser Oxydationsfermente stellen die gut charakterisierten Oxydationsfermente vor. Die Harnsäure wird durch die Urikooxydase zu Allantoin, der Alkohol durch die Alkoholoxydase zu Essigsäure oxydiert. Die charakteristischen Merkmale dieses Typus von Oxydationsprozessen sind dieselben, die die bekannten Oxydationsfermente aufweisen. Diese Fermente sind in Wasser löslich, können in Pulverform durch Aceton- oder Alkoholbehandlung dargestellt werden und weisen ein Temperaturoptimum von 55° auf. Zu bemerken ist noch, daß das Vorkommen dieser Fermente auf einige Gewebe beschränkt ist (Leber, Niere u. a.) und daß ihre Menge in den Geweben längere Zeit nach dem Tode unverändert bleibt.[1]) Der Prozeß der akzessorischen Atmung gehört zur selben Kategorie von Oxydationsprozessen, da er dieselben Eigentümlichkeiten aufweist, obgleich die Art der hierbei oxydierten Substanzen noch unbekannt ist.[2])

---

[1]) Battelli und Stern, Untersuchungen über die Urikase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 19, 219, 1909. Dieselben: Die Alkoholoxydase in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 28, 145, 1910.

[2]) Battelli und Stern, Die akzessorische Atmung in den Tiergeweben. Diese Zeitschr. 21, 487, 1909.

Den zweiten Typus von Oxydationsprozessen stellt die Oxydation der Bernsteinsäure zu Apfelsäure dar. Die wichtigsten Charaktere dieses Oxydationstypus sind die folgenden. Die Substanz oder die Substanzen, die die Oxydation der Bernsteinsäure bewirken, sind in Wasser unlöslich und werden durch Alkohol- und Acetonbehandlung vernichtet. Das Temperaturoptimum ist bei 40°, und bei 55° ist die Oxydation nur unbedeutend. Die Oxydationsenergie bleibt lange Zeit nach dem Tode des Tieres unverändert und wird durch wiederholtes und längeres Auswaschen der Gewebe mit Wasser nicht vermindert. Es muß außerdem bemerkt werden, daß alle Gewebe die Fähigkeit besitzen, Bernsteinsäure zu oxydieren.

Den dritten Typus der Oxydationsprozesse bildet die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale dieses Prozesses sind folgende. Die Substanz oder die Substanzen, die die Oxydation dieser Säuren bewirken, sind in Wasser unlöslich und werden durch Alkohol- und Acetonbehandlung vernichtet. Das Temperaturoptimum liegt ungefähr bei 40°. Die Oxydationsenergie nimmt nach dem Tode des Tieres schnell ab und wird durch wiederholtes Waschen der Gewebe mit Wasser vernichtet.

Die Haupteigenschaften dieser drei Typen von Oxydationsprozessen können durch folgendes Schema wiedergegeben werden.

	Löslichkeit in Wasser	Wirksamkeit des Alkoholniederschlages	Temperaturoptimum	Fortdauer nach dem Tode	Widerstand gegen Auswaschen mit Wasser
I. Typus (Oxydationsfermente: Alkoholoxydase, Urikooxydase u. a.)	löslich	wirksam	55°	stabil	—
II. Typus (Oxydation der Bernsteinsäure)	unlöslich	unwirksam	40°	stabil	sehr resistent
III. Typus (Verbrennung der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure)	unlöslich	unwirksam	40°	labil	sehr labil

Die Natur des die Hauptatmung bewirkenden Prozesses ist uns bisher unbekannt, und wir enthalten uns Hypothesen aufzustellen, die noch keine experimentelle Begründung haben. Wir wollen bloß bemerken, daß kein Grund vorliegt, die Haupt-

atmung sowie die Verbrennung der Citronensäure Enzymwirkungen zuzuschreiben. In der Tat ist es bis jetzt noch nicht gelungen, die Hauptatmung in Abwesenheit von Zellen oder Zelltrümmern zu erzielen, und es ist möglich, daß die physikalische Struktur der Zelle für das Zustandekommen der Hauptatmung unumgänglich notwendig sei.

XIX. Experimentelle Ergebnisse.

1. Zusatz von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu den Geweben der höheren Tiere steigert recht energisch den Gasaustausch derselben, wenn die Versuchsbedingungen günstig sind.

2. Der respiratorische Quotient der durch den Zusatz von Fumar- und Apfelsäure bewirkten Steigerung des Gasaustausches beträgt ungefähr 1,33, gleichgültig um welches Gewebe es sich handelt (Muskel, Leber, Niere).

3. Der respiratorische Quotient der durch Citronensäurezusatz bewirkten Steigerung des Gasaustausches beträgt für den Muskel gewöhnlich 1,33 oder ist bisweilen etwas höher. Dieser Quotient ist hingegen recht hoch, wenn Leber oder Niere zur Verwendung kommen, weil diese Gewebe gleichzeitig die Fähigkeit haben, Citronensäure unter Kohlensäurebildung in Sauerstoffabwesenheit zu zersetzen.

4. Der respiratorische Quotient 1,33 entspricht der vollständigen Verbrennung der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu Wasser und Kohlensäure. Man muß folglich annehmen, daß diese Säuren durch die isolierten Tiergewebe in analoger Weise verbrannt werden wie im lebenden Organismus.

5. Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wird die Citronensäure am schnellsten verbrannt; in zweiter Linie folgt die Fumarsäure und zuletzt die Apfelsäure.

6. Im allgemeinen oxydieren die Gewebe, die in vitro die stärkste Hauptatmung aufweisen, auch am energischsten die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure. Folglich sind es die roten Muskeln, die Leber und die Niere, die unter günstigen Versuchsbedingungen am stärksten die genannten Säuren oxydieren.

7. In dem Maße, wie die Hauptatmung in einem gegebenen Gewebe nach dem Tode abnimmt, verringert sich auch die

Fähigkeit des Gewebes, die Citronen-, Fumar- und Apfelsäure zu oxydieren. Die Labilität dieses Oxydationsprozesses ist je nach den Geweben der verschiedenen Tiere sehr verschieden.

Die Gewebe, die keine Hauptatmung mehr besitzen, haben auch nicht die Fähigkeit, die eben genannten Säuren zu oxydieren.

8. Die die Oxydation dieser Säuren bewirkenden Körper können nicht durch Wasser extrahiert werden. Mehrfach wiederholtes Auswaschen der Gewebe vernichtet ihre Fähigkeit, diese Säuren zu oxydieren.

9. Durch Alkohol- oder Acetonbehandlung wird die oxydierende Wirkung der Gewebe gegenüber Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufgehoben.

10. Die Oxydation dieser Säuren vollzieht sich mit gleicher Energie in neutralem oder leicht alkalischem oder auch schwach saurem Medium. Mit steigender Alkalinität des Mediums nimmt die eigentliche Hauptatmung des Gewebes bedeutend zu, während die Oxydation dieser Säuren abnimmt.

Mit steigender Acidität des Mediums nimmt die eigentliche Atmung des Gewebes viel schneller ab als die Oxydation dieser organischen Säuren.

Zusatz von Natriumphosphat hat eine ähnliche Wirkung wie die Alkalinität.

11. Das Temperaturoptimum ist ungefähr bei 40°.

12. Die Oxydationsgeschwindigkeit der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure nimmt bis zu einer gewissen Grenze mit der Konzentration derselben zu.

13. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist in reinem Sauerstoff größer als in gewöhnlicher Luft.

14. Die Oxydationsintensität nimmt im Laufe des Versuches sehr schnell ab.

15. Zusatz von Blut zu den Geweben hat auf die Oxydation der Citronensäure je nach dem Frischezustand der Gewebe eine verschiedene Wirkung.

16. Zusatz von sehr kleinen Mengen Chlornatrium zu den Geweben steigert etwas die Oxydation der früher genannten Säuren. In mittlerer Konzentration steigert Chlornatrium die eigentliche Hauptatmung des Gewebes, während es die Oxydation dieser Säuren stark herabsetzt.

17. Zusatz von Fluornatrium in mittlerer Konzentration bewirkt keine Verminderung, bisweilen sogar eine Steigerung der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure, während die eigentliche Hauptatmung des Gewebes dadurch stark herabgesetzt wird.

18. Die Blausäure, der Salicyl- und Formaldehyd, die arsenige Säure und die Galle verringern oder vernichten bereits in geringer Konzentration die Oxydation der Citronen-, Fumar- und Apfelsäure.

19. Man kann annehmen, daß der die Oxydation dieser Säuren bewirkende Prozeß mit dem der Hauptatmung der Gewebe identisch sei. Aber je nach den Versuchsbedingungen würden vorzugsweise die in den Geweben selbst enthaltenen Substanzen oder die hinzugesetzten organischen Säuren verbrannt werden.

Das Pnein ist nicht als ein Gemisch von Citronen-, Fumar- und Apfelsäure aufzufassen.

Über die Dualität der Chlorophyllane.

Von

M. Tswett.

(Eingegangen am 28. Februar 1911.)

Über diese wichtige Frage erschien im vorigen Jahre an dieser Stelle ein Aufsatz des Herrn Marchlewski[1]), der mich zu folgenden sachlichen Erörterungen nötigt.

Gegen Willstätter, der sein Phäophytin als eine einheitliche Substanz betrachtet, hebt Marchlewski hervor, „er habe früher gezeigt, daß Chlorophyllan (Phäophytin) insofern nicht einheitlich ist, als es in vielen Fällen als Gemisch zweier Chlorophyllane anzusehen ist". Nun will ich nicht bestreiten, daß Marchlewski und Malarski neuerdings (1909) Versuche ausgeführt haben, die in vollem Einklang mit der von mir (1907 und 1908) bewiesenen Dualität der Chlorophyllane

---

[1]) Diese Zeitschr. 27, 248, 1910.

stehen, da sie sich durch dieselbe am einfachsten erklären; diese Versuche besitzen aber an und für sich keine beweisende Kraft, und ich muß mich daher wundern, daß Marchlewski nicht die Untersuchungen des Forschers erwähnt, dem die genannte Erkenntnis zu verdanken ist. Um nämlich den wirklichen Beweis zu führen, daß Chlorophyllan oder Phäophytin keine einheitliche Substanzen, sondern Gemische darstellen, war nur ein Weg offen: die Trennung der Komponenten mittels physikalischer Methoden. Diesen Weg habe ich an der Hand meiner adsorptionsanalytischen Methode eingeschlagen und konnte zeigen, daß im Chlorophyllan[1]) (oder Phäophytin[2]) Gemische zweier Chlorophyllinenderivate vorliegen, die ich spektroskopisch und chemisch charakterisierte und als Chlorophyllane α und β bezeichnete.

Wenn dagegen Marchlewski und Malarski bei ihren Versuchen,[3]) das Chlorophyllan oder Phäophytin durch langdauernde, unter Erwärmung verlaufende Einwirkung von Zinkhydroxyd und Kohlensäure in „Zinkchlorophylle" verwandeln, in demselben zwei ungleich schnell reagierende Fraktionen konstatieren, so ließe sich dies Resultat ebenso gut durch eine chemische Spaltung eines einheitlichen Chlorophyllans in zwei ungleich stark weiter reagierende Bestandteile erklären. In derselben Weise glaubte ja früher Marchlewski endgültig bewiesen zu haben,[4]) daß „Chlorophyll" (Chlorophyllin α) sich unter Säureeinwirkung in Phyllocyanin und Phylloxanthin spaltet, bevor ich zeigte,[5]) daß diese Produkte autonome Derivate der genuinen Chlorophylline α und β sind; wobei die Farbstoffkomponente des Phylloxanthins (eines Gemisches) wahrscheinlich mit Chlorophyllan β identisch ist, während Phyllocyanin ein (unter wirklicher Auflösung in Salzsäure) noch tiefer zersetzter Abkömmling des Chlorophyllins α ist.

Zum Schluß muß ich betonen, daß Chlorophyllan (= Phäophytin), aus grünen Samenpflanzen, Archegoniaten oder Chlorophyceen dargestellt, höchstwahrscheinlich in allen Fällen zwiefach sein muß. Meine an zahlreichen Pflanzenspezies ausgeführten chromatographischen Chlorophyllanalysen haben nämlich immer das Vorhandensein der beiden Chlorophylline (α und β) festgestellt, welche die Mutterfarbstoffe der Chlorophyllane α und β sind.

---

[1]) Diese Zeitschr. 5, 9, 1907.

[2]) Diese Zeitschr. 10, 404, 1908.

[3]) Diese Zeitschr. 21, 531, 1909 und Bull. Acad. Cracovie, 2, 537, 1909.

[4]) Diese Zeitschr. 3, 302, 1907.

[5]) Diese Zeitschr. 5, 18, 1907; 6, 373, 1907; 10, 428, 1908.

Autorenverzeichnis.







